

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SAAD SOARES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE SEMENTE DE *Persea americana* MILL.
LAURACEAE

CURITIBA

2019

FERNANDA SAAD SOARES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE SEMENTE DE *Persea americana* MILL.
LAURACEAE.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara J. de T. Messias-Reason

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thalita Gilda Santos

CURITIBA

2019

Soares, Fernanda Saad

Caracterização química e atividade anti-inflamatória de extratos hidroalcoólicos de sementes de *Persea americana* MILL. Lauraceae [recurso eletrônico] / Fernanda Saad Soares – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Iara J. de T. Messias-Reason

Coorientadora: Professora Dra. Thalita Gilda Santos

1. *Persea americana*. 2. Cromatografia líquida de alta pressão. 3. Espectrometria de massas. 4. Análise de componente principal. 5. Macrófagos. I. Messias-Reason, Iara J. de T. II. Santos, Thalita Gilda. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.931



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA SAAD SOARES** intitulada: **Caracterização química e atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de semente de *Persea americana* Mill, Lauracea.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVADO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2019.

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RICARDO WAGNER
Avaliador Interno (UFPR)

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a todos que participaram da minha vida nestes dois anos compartilhando de todas as emoções que estiveram envolvidas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente trago aqui a explicação de três palavras que resumem o significado das pessoas que serão citadas nesta página. Gratidão: reconhecimento abrangente pelas situações e dádivas que a vida lhe proporcionou e ainda proporciona; Ubuntu: compaixão, partilha e empatia; Deus: uma eterna comunhão de três pessoas divinas. Assim como Ele, devemos ser indivíduos unitários, mas plurais ao mesmo tempo. Acredito que ciência só acontece na presença destes três fundamentos, sendo assim aqui agradeço a todos que contribuíram para que esta pesquisa e fase da minha vida pudesse ser cumprida com êxito.

Aos meus pais Rose Marie e Jair que além de serem meus maiores exemplos, sempre me apoiaram e incentivaram em todas as decisões que levassem ao meu crescimento pessoal e profissional, e principalmente a minha felicidade.

As minhas tias Miriam e Norma por todo o suporte que me deram desde a minha graduação na UFPR.

A Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de fazer parte desta vida acadêmica e deste universo que é a ciência. Minha segunda casa.

A Professora Dr^a Iara Messias que confiou e entregou em minhas mãos a responsabilidade de desenvolver este projeto gratificante.

Ao Professor Dr. Cid Aimbiré do Laboratório de Farmacognosia (LAGNOS) - UFPR por ter aberto as portas de seu laboratório, cedendo a estrutura para que o projeto pudesse ser desenvolvido.

Ao Professor Dr. Roberto Pontarolo, assim como toda sua equipe do Laboratório Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB) – UFPR, por também ceder a estrutura e equipamentos para as análises em CLUE-QToF-EM.

A Professora Dr. Amanda Crisma do Laboratório de Hematologia -UFPR, pela confiança, determinação e amizade. Por ter aceito a parceria para o desenvolvimento dos ensaios biológicos e estar sempre disposta a me ensinar, orientar e compartilhar deste outro universo fantástico que são as células. Sou extremamente grata por sua disponibilidade e paixão em compartilhar todo seu conhecimento.

A Farmacêutica Maria da Graça da Central Analítica pela amizade e todo o suporte nas análises por CLAE-DAD.

A Professora Dr^a Beatriz Helena L. de N. S. Maia e seus alunos do Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química (LAPNEQ) – UFPR por me receberem quando a eles recorri.

Aos alunos do Laboratório LAGNOS, meus companheiros diários de trabalho, que sempre me auxiliaram quando necessitei, mesmo que para um café temperado de desabafos, ou para companhia em jornadas noturnas. Minha equipe “top”.

A Professora Dr^a Helga Gabriela Aleme da Unifesp, pelo auxílio, disponibilidade e dedicação com as análises quimiométricas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento que adquiri nesses dois anos.

Aos Professores Dr. Ricardo Wagner e Dr^a Beatriz Helena L. de N. S. Maia por participarem como banca avaliadora, contribuindo e enriquecendo este trabalho.

Como dito anteriormente, ciência é também partilha e compaixão, assim agradeço aos meus amigos Rebeca, Me. Allan, Victor, Mariana Atherino, Ma. Mariana Facchi, Ma. Melissa, Alcindo e Naldery por dividirem os cálculos, o tempo, as inseguranças, cafés, incertezas, anseios, lutas e conquistas comigo. Obrigada pelos abraços, lágrimas e sorrisos compartilhados.

Ao meu namorado Guilherme Alencar por ter sido meu suporte desde o início desta jornada, me aconselhando nas dúvidas profissionais e anseios pessoais, e me acompanhando em todas as encruzilhadas que a ciência nos coloca. Meu exemplo de determinação, pesquisador e professor.

E para finalizar, a minha maior gratidão é pela Professora Thalita G. Santos do Laboratório de Farmacognosia - UFPR e que coordena a equipe LAGNOS. Obrigada por ter aberto as portas do laboratório junto com o Prof Cid. Obrigada por sempre confiar no meu potencial, me incentivar, estimular, aconselhar, orientar, ensinar, “traulitar” e abraçar as causas comigo. Por trás de uma mulher bem-sucedida tem **outra mulher!** Obrigada por contribuir na construção da profissional que sou hoje. Eu não tenho palavras pra expressar o quanto aprendi com você, uma profissional excepcional. Sou sua fã. Que eu consiga ser esta professora, mentora e orientadora magnífica que és!

*“Avalia-se a inteligência de um indivíduo
pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar.”*

Immanuel Kant

RESUMO

A espécie *Persea americana* Mill. (Lauraceae) popularmente conhecida como abacateiro tem aplicação diversa na etnomedicina, sendo o extrato hidroalcoólico da semente utilizado em fricções externas contra reumatismo e dores articulares. Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização química do extrato hidroalcoólico da semente de *P. americana* e avaliar seu potencial anti-inflamatório em macrófagos. Extratos de sementes coletadas em Curitiba-PR e Rosário do Ivaí-PR foram analisados a partir de um planejamento fatorial 2^3 , em períodos de maturação (maduro e imaturo), granulometria (pó finíssimo, semi fino e grosso), grau alcoólico (30%, 50% e 70% (v/v)) e tempo de maceração (24h, 72h e 168h) distintos, a fim de avaliar a influência destes fatores na composição química e atividade biológica dos extratos. O perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico 70% (v/v) foi determinado por CLAE-DAD e 46 substâncias foram identificadas por CLUE-ESI-QToF-EM nos modos positivo e negativo de ionização. Através da análise quimiométrica por Análise de Componentes Principais (ACP) discriminou os extratos, preparados nas condições especificadas no planejamento fatorial, por região de coleta e grau alcoólico, sendo os extratos preparados em álcool etílico 50% e 70% (v/v) agrupados e discriminados dos extratos preparados com álcool etílico 30% (v/v). Para investigação do potencial biológico, foram analisados os extratos de sementes maduras e imaturas das duas regiões de coleta e em 3 condições do planejamento fatorial: (1) álcool etílico 70% (v/v), pó finíssimo, 24h de maceração, (8) álcool etílico 30% (v/v), pó grosso, 168h de maceração e (9) álcool etílico 30% (v/v), pó semifino, 72h de maceração, quanto a sua citotoxicidade através do método de Redução do sal de Tetrazólio (MTT), e atividade sobre a produção de óxido nítrico por método de Griess e citocinas inflamatórias por método de ELISA, em macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados com 2,5 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS). Os extratos da condição (1) de sementes coletadas em Rosário do Ivaí não tiveram atividade significativa sobre a produção de óxido nítrico, entretanto os extratos de sementes coletadas em Curitiba que apresentaram atividade significativa ($p < 0,05$). Os extratos das sementes provenientes das duas regiões, nas condições (8) e (9) também apresentaram atividade significativa ($p < 0,01$). Entretanto, analisando-se a atividade dos mesmos extratos sobre a produção de citocinas anti-inflamatória (IL-10) e pró-inflamatórias (KC e IL-6), nenhum apresentou atividade significativa. O método para perfil cromatográfico, a identificação das substâncias dos extratos, bem como a atividade sobre a produção do óxido nítrico por macrófagos indicam que a granulometria do pó e o tempo de maceração não influenciam na diferenciação dos extratos, porém o grau alcoólico discrimina os extratos quimicamente e biologicamente, sendo os extratos produzidos com álcool etílico 70% e 50% (v/v) semelhantes enquanto discriminados dos extratos produzidos com álcool etílico 30% (v/v). Desta forma, verifica-se que as sementes de *P. americana* utilizadas popularmente e atualmente consideradas sub-produto e produto de descarte, apresentam-se como fonte de substâncias bioativas com potencial anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Persea americana*. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Espectrometria de massas. Análise de componente principal. Macrófagos.

ABSTRACT

The *Persea americana* Mill. (Lauraceae) specie is popularly known as avocado tree and it shows many applications in the ethnomedicine. The hydroethanolic extract produced from the seeds is used externally to treat rheumatism and articular pain. The aim of the present study is to chemically characterize the hydroethanolic extract of the *P. americana* seeds and to investigate its anti-inflammatory potential over macrophages cells. The extracts of the seeds collected in Curitiba-PR and Rosário do Ivaí-PR were analyzed following a 2³ factorial design, in different maturation state (ripe and unripe), particle size (fine powder, medium powder and coarse powder), ethyl alcohol concentration (30%, 50% and 70% (v/v)) and maceration time (24h, 72h and 168h), in order to evaluate the influence of these factors on the chemical composition and biological activity of the extracts. The chromatographic profile of hydroalcoholic extract 70% (v/v) was determined by HPLC-DAD and 46 substances were identified by UPLC-ESI-QToF-MS in positive and negative ionization mode. The chemometric analysis by Principal Component Analysis (PCA) discriminated the extracts prepared under the conditions specified in the factorial design, by location and alcohol concentration. The extracts prepared by ethyl alcohol 50% and 70% (v/v) were grouped and discriminated from extracts prepared with ethyl alcohol 30% (v/v). To investigate the biological potential, the extracts of ripe and unripe seeds from the two locations were analyzed in three conditions of the factorial design: (1) ethyl alcohol 70% (v/v), fine powder, 24h maceration, (8) 30% (v/v) ethyl alcohol, coarse powder, 168h maceration, and (9) 30% (v/v) ethyl alcohol, medium powder, 72h maceration. It was analyzed the cytotoxicity by the Reduction of Tetrazolium Salt (MTT), and the activity on the production of nitric oxide by Griess method and inflammatory cytokines by ELISA in murine macrophages (RAW 264.7) stimulated with 2.5 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS). Extracts from the condition (1) of seeds collected in Rosário do Ivaí did not show significant activity on the production of nitric oxide, however the seed extracts collected in Curitiba showed significant activity ($p < 0.05$). Seed extracts from the two location under conditions (8) and (9) also showed significant activity ($p < 0.01$). However, analyzing the activity of the same extracts on the production of anti-inflammatory (IL-10) and pro-inflammatory cytokines (KC and IL-6), none showed significant activity. The method for chromatographic profile, the identification of extract substances as well as the activity on the production of nitric oxide by macrophages indicate that the particle size and the time of maceration does not influence the differentiation of the extracts while the ethyl alcohol concentration discriminates the extracts chemically and biologically; the extracts produced with ethyl alcohol 70% and 50% (v/v) act similarly however they act differently from the extracts produced with ethyl alcohol 30% (v/v). In this way, it was verified that the seeds of *P. americana* popularly used and currently considered an avocado by-product are the source of bioactive substances with anti-inflammatory potential.

Keywords: *Persea americana*. Chromatography, High Pressure Liquid. Mass spectrometry. Principal Component Analysis. Macrophage.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– SEMENTES DE ABACATE VERDE COLETADO EM CURITIBA-PR.....	48
FIGURA 2	– FLUXOGRAMA DE DESENVOLVIMENTO.....	50
FIGURA 3	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS I E II, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETILICO 30%, (V/V)), LEITURA EM 269 nm.....	62
FIGURA 4	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO II COM OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA.	62
FIGURA 5	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS III, IV, V, VI e VII, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm	64
FIGURA 6	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO VIII, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm.....	65
FIGURA 7	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO IX, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 269 nm.....	65
FIGURA 8	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI E XVII, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm	66
FIGURA 9	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD , MÉTODOS XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV E XXV, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% V/V), LEITURA EM 260 nm.....	67
FIGURA 10	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO XXVI, AMOSTRA AL.V (EM ALCOL ETÍLICO 70% V/V), LEITURA EM 260 nm.....	68
FIGURA 11	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, DA AMOSTRA AL.v, LEITURA EM 269 nm. MÉTODOS XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII E XXXIV. OTIMIZAÇÃO DE FASE MÓVEL.....	69

FIGURA 12	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, DA AMOSTRA AL.V, EM 269 nm, MÉTODO XXXII.....	70
FIGURA 13	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLUE-ESI-QToF-EM DAS AMOSTRAS AL.V.2, AL.M.2, CWB.V.2 E CWB.M.2 (1,0 mg/mL), ES+.....	73
FIGURA 14	– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLUE-ESI-QToF-EM DAS AMOSTRAS AL.V.2, AL.M.2, CWB.V.2 E CWB.M.2 (1,0 mg/mL), ES-.....	74
FIGURA 15	– PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES+ (1) E CLAE-DAD (2), DA AMOSTRA AL.V.....	75
FIGURA 16	– PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DA CATEQUINA ES+ E ES-.....	76
FIGURA 17	– PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO E ESPECTRO MS/MS DA PROCIANIDINA TIPO A DÍMERO, TRÍMERO E TETRÂMERO...	78
FIGURA 18	– GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	91
FIGURA 19	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	92
FIGURA 20	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	93
FIGURA 21	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	94
FIGURA 22	– GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M)	95

	NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	
FIGURA 23	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	95
FIGURA 24	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	96
FIGURA 25	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	97
FIGURA 26	– GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	98
FIGURA 27	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	98
FIGURA 28	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	99
FIGURA 29	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	100
FIGURA 30	– GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE	

	EXTRAÇÃO	DO	PLANEJAMENTO	
	FATORIAL.....			101
FIGURA 31	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			101
FIGURA 32	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			102
FIGURA 33	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			103
FIGURA 34	– GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			104
FIGURA 35	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			104
FIGURA 36	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			105
FIGURA 37	– GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....			106
FIGURA 38	– ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA OBSERVADA EM ENSAIO MTT			110

FIGURA 39	– CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UPLC-QTOF-EM, DA AMOSTRA CWB.M NAS TRÊS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO, EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO.....	113
FIGURA 40	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA AL.V.1 e AL.M.1, EM TRIPLICATA.....	139
FIGURA 41	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA CWB.V.1 E CWB.M.1, EM TRIPLICATA.....	139
FIGURA 42	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA AL.V.8 e AL.M.8, EM TRIPLICATA.....	139
FIGURA 43	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA CWB.V.8 E CWB.M.8, EM TRIPLICATA.....	140
FIGURA 44	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA AL.V.9 EM DUPLICATA E AL.M.9 EM TRIPLICATA..	140
FIGURA 45	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES+, DA AMOSTRA CWB.V.9 E CWB.M.9, EM DUPLICATA.....	140
FIGURA 46	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM, ES-, DA AMOSTRA AL.V.1 E AL.M.1, EM TRIPLICATA.....	141
FIGURA 47	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM, ES-, DA AMOSTRA CWB.V.1 E CWB.M.1, EM TRIPLICATA.....	141
FIGURA 48	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES-, DA AMOSTRA AL.V.8, EM TRIPLICATA.....	141
FIGURA 49	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES-, DA AMOSTRA CWB.V.8 EM TRIPLICATA E CWB.M.8 EM DUPLICATA, EM TRIPLICATA.....	142
FIGURA 50	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES-, DA AMOSTRA AL.V.9 E AL.M.9, EM TRIPLICATA.....	142
FIGURA 51	– CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES-, DA AMOSTRA CWB.V.9 E CWB.M.9, EM DUPLICATA.....	142
FIGURA 52	– GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	144

FIGURA 53 – GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	145
FIGURA 54 – GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	146
FIGURA 55 – GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	147
FIGURA 56 – GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	148

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO IDEAL POR MÉTODO DE MTT	111
GRÁFICO 2 – MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTICO POR MACRÓFAGOS (RAW 264.7).....	113
GRÁFICO 3 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS POR MACRÓFAGOS (RAW 264.7)	115

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE <i>Persea americana</i> MILL.- LAURACEAE.....	27
QUADRO 2 – AMOSTRAS COLETADAS DE <i>P. americana</i>	49
QUADRO 3 – NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	143
QUADRO 4 – NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M E AL.M UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	144
QUADRO 5 – QUADRO 5 – NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.V E CWB.M UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	145
QUADRO 6 – NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS AL.M E AL.V UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	146
QUADRO 7 – NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M E CWB.V, UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	147

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXTRAÇÃO	49
TABELA 2 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS AL.V, AL.M, CWB.V E CWB.M	60
TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES ⁻	82
TABELA 4 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QToF-EM, ES ⁺	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

\$	Dólares
%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
μ	micro
ACN	Acetonitrila
AINES	Anti-inflamatório não esteroidais
AR	Artrite Reumatoide
atm	atmosfera
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies reativas de Nitrogênio
EtOH	Álcool etílico
h	Horas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
kg	quilogramas
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
<i>m/z</i>	Razão massa e carga

mAU	mili Unidades de Absorvância
MBM	Museu Botânico Municipal
MeOH	Álcool metílico
mg	miligramas
min.	Minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MTT	brometo de 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF	Fator Nuclear
ng	nanogramas
NO	Óxido Nítrico
OA	Osteoartrite
ACP	Análise de Componentes Principais
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
ppm	Partes por milhão
PR	Paraná
QToF	Quadrupolo Tempo de Vôo
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
tr	Tempo de Retenção
SBF	Soro Bovino Fetal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFPR	Universidade Federal do Paraná
α	alfa
β	beta
γ	gama
κ	kappa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	<i>PERSEA AMERICANA</i> MILL. LAURACEAE	24
2.1.1	Constituintes fenólicos – atividade antioxidante e anti-inflamatória.....	37
2.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE	38
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS.....	40
2.4	INFLAMAÇÃO	41
2.4.1	A participação dos macrófagos na inflamação	42
2.4.2	OSTEOARTRITE.....	44
2.4.2.1	Tratamento <i>on label</i>	45
2.5	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	48
3.1.1	Preparo dos extratos de <i>Persea americana</i> Mill.....	49
3.1.1.1	Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD. .	50
3.1.1.2	Perfil cromatográfico e identificação de metabólitos secundários por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à espectrometria de massas-QToF.....	53
3.1.1.3	Pré-tratamento dos dados obtidos da análise por CLUE-ESI-QToF-EM.	54
3.1.1.4	Processamento dos biomarcadores identificados pelo software MarkerLynx™ XS através da análise de componentes principais.	55
3.2	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	55
3.2.1	Cultura de células RAW 264.7.	55
3.2.1.1	Determinação da concentração de tratamento do extrato bruto pelo método de Redução do Sal de Tetrazólio (MTT).....	56
3.2.1.2	Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7).....	57
3.2.1.3	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.	57

3.2.1.4	Análises estatísticas	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO.....	59
4.2	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO E PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – DAD.	61
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 70% (V/V) DA SEMENTE DE <i>P. AMERICANA</i> POR CLUE-ESI-QTOF-EM.	71
4.4	PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	90
4.5	AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	107
4.5.1	Determinação da concentração de extrato bruto utilizada para tratamento das células RAW 264.7.	107
4.5.2	Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com extratos hidroalcoólicos de sementes de <i>P. americana</i>	111
4.5.3	Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com extratos hidroalcoólicos de sementes de <i>P. americana</i>	114
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
	PERSPECTIVAS FUTURAS	118
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMAS	139
	APÊNDICE 2 – DADOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.	143
	ANEXO 1 – DEPÓSITO DE EXSICATAS MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA.....	149
	ANEXO 2 – CADASTRO DE ATIVIDADE DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO - SISGEN	150

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática secular e o Brasil país de maior biodiversidade do planeta detém um valioso conhecimento tradicional. Grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 85% destes utilizam plantas ou preparações derivadas (BRASIL, 2006).

As plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental na saúde mundial mesmo com os avanços na medicina moderna, e estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos sejam direta ou indiretamente derivados destas (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; SHU, 1998; KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2019). As principais empresas farmacêuticas têm demonstrado interesse em investigar plantas como fontes para novas substâncias sintéticas e também para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos padronizados com comprovada eficácia, segurança e qualidade (DE SMET, 1997; SHU, 1998).

Este interesse da população por terapias consideradas naturais vem aumentando não somente em países em desenvolvimento, mas, principalmente nos países industrializados, aumentando consideravelmente o comércio internacional de medicamentos à base de plantas e atraindo as indústrias farmacêuticas, que começaram a incluir esta linha de produtos aos seus portfólios (CALIXTO, 2000). Além disso, as revistas científicas vêm também publicando notadamente muitos estudos científicos básicos e clínicos sobre o potencial biológico de drogas vegetais (CALIXTO, 2000).

A espécie *Persea americana* Mill.- Lauraceae popularmente conhecida como abacateiro e nativa da América Central (México, Guatemala, Honduras), é atualmente cultivada nos Estados Unidos, África do Sul, Ásia Tropical, países da América do Sul e em todo o Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (TESKE; TRENTINI, 1997; ROSS, 1999; GRANDI, 2014). Esta espécie tem aplicação diversa na etnomedicina, sendo suas folhas, frutos, cascas e sementes utilizados pela população como vermífugo, diurético, colagogo, carminativo, para diarreia, hipertensão arterial, entre outros (GRANDI, 2014). O extrato da semente é utilizado em fricções externas contra reumatismo e dores articulares (GRANDI, 2014).

Na osteoartrite (OA), doença articular, macro e micro lesões levam ao estresse celular e degradação da matriz extracelular das articulações sinoviais, que

ativa de forma inadequada as vias pro-inflamatórias da imunidade inata e desta forma inicia um metabolismo anormal do tecido articular seguido de alterações anatômicas e fisiológicas como degradação da cartilagem, remodelação óssea e inflamação das articulações (GREENE; LOESER, 2015; MOBASHERI et al., 2015). Embora a etiologia das doenças crônicas articulares não seja clara, acredita-se que a resposta imune superinflamatória seja uma das principais causas de seu desenvolvimento, sendo os macrófagos células importantes na patogênese desses distúrbios (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Desta forma, o uso clínico de agentes que visam a modulação de macrófagos provavelmente apresenta eficácia no tratamento destas doenças (KOH; DIPIETRO, 2011; DAGHESTANI; PIEPER; KRAUS, 2015; KRAUS et al., 2016; USHIO et al., 2017).

Não foram ainda descritos na literatura tratamentos que levam à cura da OA, apenas alívio dos sintomas de dor e inflamação, para assim preservar a mobilidade articular e prevenir a incapacidade funcional. Dentre os fármacos recomendados estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) tópicos e orais, AINES seletivos para COX-2 e corticosteroides intra-articulares (DEAL et al., 1991; MOORE et al., 1998; GRACE et al., 1999; COIMBRA et al., 2004; SARZI-PUTTINI et al., 2005; ZHANG et al., 2010a; b; HOCHBERG et al., 2012). Recentemente tem-se prescrito medicamentos à base de plantas como confrei (*Symphytum officinale* L.) utilizado por via tópica (GRUBE et al., 2007; CAMERON; CHRUBASIK, 2013) e medicamentos de uso oral como *Boswellia serrata* Roxb., *Persea americana* Mill. e *Glycine max* (L.) Merr. (HENROTIN et al., 2011; CAMERON; CHRUBASIK, 2014; MOURA MDEL et al., 2016) que vêm ganhando espaço mundialmente. Embora seus mecanismos de ação ainda não tenham sido elucidados em detalhes, os medicamentos anti-inflamatórios à base de drogas vegetais apresentam amplo espectro, interagindo em vários níveis com a cascata inflamatória e com a produção de citocinas que são os principais mediadores da destruição da cartilagem (CHRUBASIK; ROUFOGALIS; CHRUBASIK, 2007). Atualmente, o nutracêutico mais promissor e recomendado pelos reumatologistas têm sido o produzido à base de óleos insaponificáveis de abacate (*Persea americana*) e de soja (*Glycine max*) (ERNST, 2003), por apresentar atividade anti-inflamatória e menos efeitos adversos comparado aos AINES (AU et al., 2007; OWNBY et al., 2014; GOUDARZI et al., 2017).

Apesar de haver diferentes alternativas para o manejo de doenças articulares, são poucos os medicamentos tópicos à base de plantas disponíveis no mercado. A

alta prevalência dessas doenças, o custo relativamente baixo para produção de fitoterápicos tópicos em comparação aos medicamentos sintéticos, o amplo cultivo do abacate no Brasil e o potencial farmacológico de suas sementes com amplo uso popular estimulam a investigação de sua ação anti-inflamatória.

Além disso, visto que a semente do abacate consitui em média 25% do peso do fruto, a reutilização de subprodutos do abacate pode reduzir o impacto negativo sobre o meio ambiente assim como agregar valor comercial à estes, visto que são fontes importantes de compostos fitoquímicos e desta forma o seu reaproveitamento pode conferir interesse à indústria farmacêutica.

Considerando-se que na medicina popular não há uma padronização na elaboração de extrato e suas preparações, torna-se relevante avaliar a composição química e otimizar fatores de extração e maturação para o desenvolvimento de extrato, bem como investigar o potencial anti-inflamatório de diferentes extratos deste subproduto da *Persea americana*, que atualmente é descartado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização química dos extratos hidroalcoólicos das sementes de *Persea americana* Mill. (Lauraceae) e avaliar *in vitro* seu potencial imunomodulador sob macrófagos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter as sementes de *P. americana* em diferentes localidades (em Rosário do Ivaí -PR e Curitiba-PR) para realização dos ensaios;
- Desenvolver e otimizar o método para perfil cromatográfico do extrato bruto por CLAE-DAD;
- Caracterizar quimicamente o extrato hidroalcoólico das sementes de *P. americana* através de CLUE-ESI-QToF-EM;
- Avaliar a influência de fatores de extração, geográficos e de maturação, no perfil químico através de Análise de Componentes Principais (ACP);

- Avaliar a modulação da função inflamatória de macrófagos (*in vitro*) utilizando-se macrófagos murinos Raw 264.7, através da padronização da concentração do extrato bruto pelo método de Redução do sal de Tetrazólio (MTT), avaliação da produção do óxido nítrico (NO) por Griess e quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por ELISA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Persea americana* MILL. LAURACEAE

Conhecida popularmente como abacateiro, a espécie *Persea americana* pertence à família Lauraceae e é nativa da América Central (México, Guatemala, Honduras). Atualmente esta espécie é também encontrada nos trópicos e subtropicais, sendo cultivada nos Estados Unidos, África do Sul, Ásia Tropical, países da América do Sul e em todo o Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (TESKE; TRENTINI, 1997; ROSS, 1999; GRANDI, 2014). A árvore de *P. americana* mede de 10 a 15 metros, possui córtex aromático e caule lenhoso, e suas folhas são lisas, semi-coriáceas, de cor verde escura, formato oval-oblongas, de margens inteiras, mais ou menos onduladas (YASIR; DAS; KHARYA, 2010; ANVISA, 2010).

Acredita-se que os navegadores tiveram contato com abacate já no início do descobrimento da América, sendo a espécie conhecida na Colômbia em 1519 e depois no México em 1532 (DONADIO, 1995). O nome "Abacate" originou-se do náuatle, língua falada por grupos indígenas que habitavam o México e El Salvador. O vocábulo āhuacatl, naquele idioma, significa "testículo" e foi utilizado para nomear o fruto, e por seu nome ser de origem indígena, é possível que este fruto já era utilizado pelos nativos na América Central antes de se difundir por todo o continente americano por volta do século XVII (DONADIO, 1995).

O México é o maior produtor de abacates, seguido por República Dominicana, Peru e Indonésia e o Brasil se encontrava na oitava posição no ano de 2016 produzindo 195 mil toneladas, correspondendo a 3,2 % da produção mundial, sendo as variedades brasileiras em sua maioria híbridas entre as raças Antilhana e Guatemalense, e conhecidas como Geada, Fortuna, Quintal, Margarida e Breda. Os estados que mais produzem são Minas Gerais, São Paulo e o Paraná (ALMEIDA, 2018). Em relação a exportação, somente no mês de janeiro dos anos de 2016, 2017 e 2018 o Brasil exportou respectivamente 13.000, 29.212 e 18.474 kg de abacates equivalentes à \$23.237,00, \$50.077,00 e \$31.021,00 dólares (CONAB, 2018).

Apesar do uso histórico das sementes de abacate na medicina popular e os avanços nas pesquisas sobre as propriedades farmacêuticas desta espécie, há poucos relatos na literatura sobre o potencial de suas atividades biológicas. Algumas

das atividades previamente relatadas incluem: anticâncer (LEE et al., 2008), anti-inflamatória (ROSENBLAT et al., 2011), antidiabética (EDEM; EKANEM; EBONG, 2009), antihipertensiva (ANAKA; OZOLUA; OKPO, 2009; KATE; LUCKY, 2009; KATE; AMAECHINA, 2010; ODUBANJO; OBOH; MAKINDE, 2016), efeito hipocolesterolemico (KATE; LUCKY, 2009; NWAOGUIKPE; BRAIDE, 2011; PAHUA-RAMOS et al., 2012; SHEHATA; SOLTAN, 2013), efeitos cicatrizantes (WERMAN; MOKADY; NEEMAN, 1990; MOY, 1998; ROSENBLAT et al., 2011; RAMOS-JERZ et al., 2013), atividade antimicrobiana (NAGARAJ et al., 2010; RAYMOND CHIA; DYKES, 2010; SANCHEZ et al., 2013; SALAZAR et al., 2017), inseticida (ABE et al., 2005; LEITE et al., 2009) e a toxicidade de extratos (LEITE et al., 2009; OZOLUA et al., 2009; PADILLA-CAMBEROS et al., 2013).

Quanto ao fruto, há estudos que indicam o potencial anticancer (OBERLIES et al., 1998; DING et al., 2007; DING et al., 2009), antibacteriano (CASTILLO-JUAREZ et al., 2009), inseticida (OBERLIES et al., 1998), cicatrizante (NAYAK; RAJU; CHALAPATHI RAO, 2008), hipoglicemico (ANTIA; OKOKON; OKON, 2005) e hipocolesterolemico (SHEHATA; SOLTAN, 2013). As pesquisas realizadas a partir das folhas da *Persea americana* demonstram atividade anti-inflamatória (GUEVARRA et al., 1998; ADEYEMI; OKPO; OGUNTI, 2002), anticonvulsivante (OJEWOLE; AMABEOKU, 2006), vasorelaxante (OWOLABI; JAJA; COKER, 2005), analgésica (ADEYEMI; OKPO; OGUNTI, 2002), hipotensiva (ADEBOYE et al., 1999), antiviral (ALMEIDA et al., 1998) e anti-HIV-1 (WIGG et al., 1996).

Em relação a sua caracterização química, há muitos compostos identificados nas diferentes partes do abacateiro (QUADRO 1), mas até o momento não há relatos quanto à caracterização do extrato hidroalcoólico 70% (v/v) das sementes obtidos por maceração, a influência de fatores de extração, bem como influência de localização geográfica e de maturação na composição química deste extrato utilizado popularmente.

QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
1,2,4-trihidróxiheptadec-16-eno (avocadoeno)		$C_{17}H_{34}O_3$	semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
			folhas	álcool etílico	(GUEVARRA et al., 1998)
			polpa	álcool etílico 95 %	(OBERLIES et al., 1998)
			casca	diclorometano	(ADIKARAM et al., 1992)
			semente e polpa	acetoneitrila: álcool metílico	(AHMED et al., 2018)
1,2,4-trihidróxiheptadec-16-ino (avocadino)		$C_{17}H_{32}O_3$	polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
			semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
			polpa	álcool etílico 95 %	(OBERLIES et al., 1998)
			casca	diclorometano	(ADIKARAM et al., 1992)
			semente e polpa	acetoneitrila: álcool metílico	(AHMED et al., 2018)
1,2,4-triidróxinonadecano		$C_{19}H_{40}O_3$	polpa	álcool etílico 95 %	(OBERLIES et al., 1998)
			polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
1,4-diacetóxi-2-hidróxiheptadec-16-eno		$C_{21}H_{38}O_5$	polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
1,8,11-heptadecatrienilfurano		$C_{21}H_{32}O$	polpa	----	(SAONA et al., 1998)
1-acetóxi-2,4-dihidróxi-heptadec-16-ino (acetato de avocadoeno)		$C_{19}H_{34}O_4$	semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
			polpa	----	(DOMERGUE et al., 2000)
			polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(HASHIMURA et al., 2001)
			semente e polpa	acetoneitrila: álcool metílico	(AHMED et al., 2018)
1-acetóxi-2,4-diidróxi-n-heptadeca-16-eno (acetato de avocadoeno)		$C_{19}H_{34}O_4$	casca	diclorometano	(ADIKARAM et al., 1992)
			semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			polpa	----	(DOMERGUE et al., 2000)
			semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
			polpa	álcool metílico	(HASHIMURA et al., 2001)
1-hidróxiheicosa-2,12,15-trien-4-ona		$C_{21}H_{36}O_2$	polpa, semente, casca	acetona	(RODRIGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
			semente e polpa	acetoneitrila: álcool metílico	(AHMED et al., 2018)
			polpa	hexano	(KAWAGISHI et al., 2001)

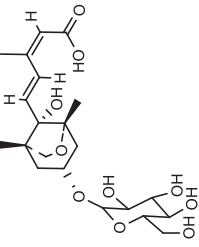
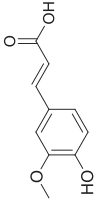
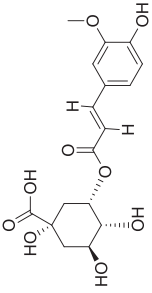
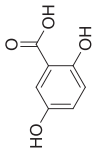
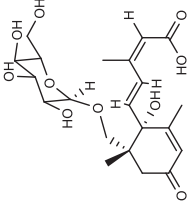
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
1-hidróxiheptacososa-2, 5, 12, 15-tetraen-4-ona		$C_{21}H_{34}O_2$	polpa	hexano	(KAWAGISHI et al., 2001)
2-(12 trideceniil) furano (avocado furano)		$C_{17}H_{28}O$	semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
2-(12-trideceniil) furano (avocado furano)		$C_{17}H_{26}O$	semente	hexano	(KASHMAN; NEEMAN; LIFSHTITZ, 1969b)
2-heptadecilfurano		$C_{21}H_{38}O$	polpa	-----	(SAONA et al., 1998)
2-pentadecenilfurano		$C_{20}H_{34}O$	polpa	-----	(SAONA et al., 1998)
2-pentadecilfurano		$C_{19}H_{34}O$	polpa	-----	(SAONA et al., 1998)
8, 11-heptadecadienilfurano		$C_{21}H_{34}O$	polpa	-----	(SAONA et al., 1998)
acetato de avocadenino		$C_{19}H_{32}O_4$	polpa, semente, casca	acetona	(RODRIGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
ácido 4-hidróxibenzoico		$C_7H_6O_3$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
ácido benzóico		$C_7H_6O_2$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
ácido cafeico		$C_9H_8O_4$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa, casca e semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)

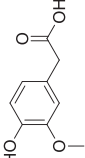
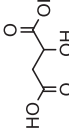
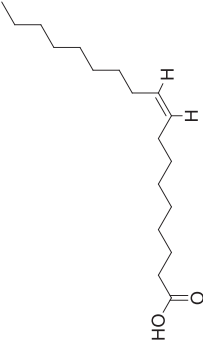
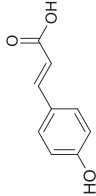
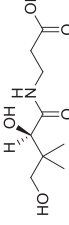
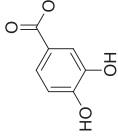
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
ácido cafeoilquínico		$C_{16}H_{18}O_9$	semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			semente	álcool etílico 80%	(TREMOCOLDI et al., 2018)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
			semente	álcool etílico 80%	(KOSÍŇSKA et al., 2012)
			casca	álcool etílico 80%	(KOSÍŇSKA et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)**
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			semente	álcool metílico 75%	(RAMOS et al., 2012)**
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			semente	álcool metílico	(RAMOS-JERZ et al., 2013)**
ácido cinâmico		$C_9H_8O_2$	polpa	álcool metílico	(FERNÁNDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)**
			polpa	álcool metílico	(FERNÁNDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)**
			folha	álcool etílico 35%	(GUTIERREZ, 2011)
			polpa e semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
ácido cítrico		$C_6H_8O_7$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
ácido coumaroilquínico		$C_{16}H_{18}O_8$	semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
ácido diidrocafeico		$C_9H_{10}O_4$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente))	(FIGUEROA et al., 2018)
ácido elágico		$C_{14}H_6O_8$	polpa	álcool metílico	(FERNÁNDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)

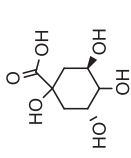
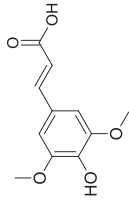
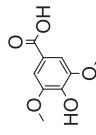
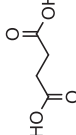
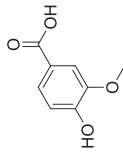
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
ácido epididrofaseico glucosídeo		$C_{22}H_{36}O_{10}$	semente	desengordurado com n-hexano e extraído com álcool metílico	(DEL REFUGIO RAMOS et al., 2004)
ácido ferúlico		$C_{10}H_{10}O_4$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
ácido feruloiquínico		$C_{17}H_{20}O_9$	polpa	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
ácido gentísico		$C_7H_6O_4$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
ácido hidróxiabscísico glucosídeo		$C_{21}H_{30}O_{10}$	semente	desengordurado com n-hexano e extraído com álcool metílico	(DEL REFUGIO RAMOS et al., 2004)
			semente	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)




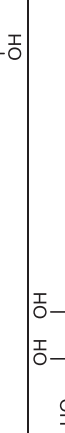
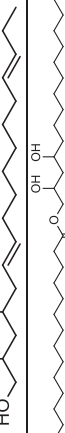
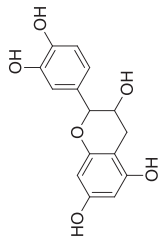
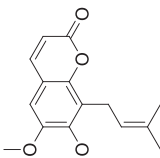
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
ácido homovanílico		$C_9H_{10}O_4$	polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
ácido málico		$C_4H_6O_5$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
ácido oleico		$C_{18}H_{34}O_2$	polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
ácido p-cumárico		$C_9H_8O_3$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
			polpa	hexano e álcool metílico.h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
ácido pantonênico		$C_9H_{17}NO_5$	polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			semente	álcool metílico 75 %	(RAMOS et al., 2012)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	hexano e álcool metílico.h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
ácido protocatecuico		$C_7H_6O_4$			

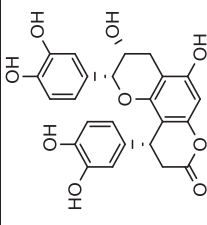
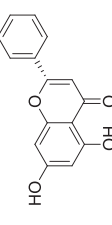
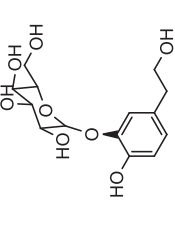
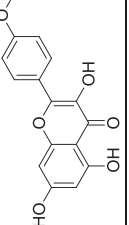
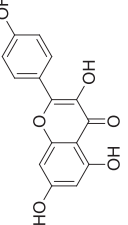
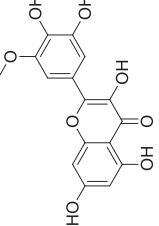
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PARTES UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
ácido quínico		$C_7H_{12}O_6$	polpa, casca e semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente) álcool metílico	(FIGUEROA et al., 2018) (RAMOS-JERZ et al., 2013)
ácido sinapínico		$C_{11}H_{12}O_5$	polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			polpa	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			semente	álcool metílico 75 %	(RAMOS et al., 2012)
ácido siríngico		$C_9H_{10}O_5$	semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
ácido succínico		$C_4H_6O_4$	polpa	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			semente	álcool metílico 75 %	(RAMOS et al., 2012)
ácido vanílico		$C_8H_8O_4$	semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)

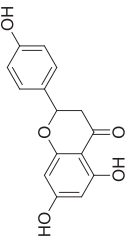
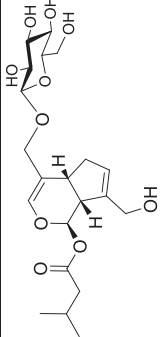

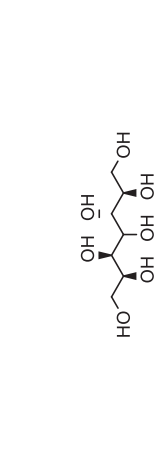



QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
avocadenol a		C ₁₇ H ₃₂ O ₃	polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
avocadenol b		C ₁₇ H ₃₀ O ₃			
avocadenol c		C ₁₇ H ₃₂ O ₄			
avocadenol d		C ₁₇ H ₃₂ O ₃			
avocadoína		C ₃₃ H ₆₄ O ₄			
catequina		C ₁₅ H ₁₄ O ₆	semente, polpa e casca	acetona: h ₂ O	(RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			semente	álcool etílico 80%	(KOSÍŇSKA et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
cedrelopsina		C ₁₅ H ₁₆ O ₄	folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
			semente	álcool etílico 80%	(TREMOCOLDI et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)

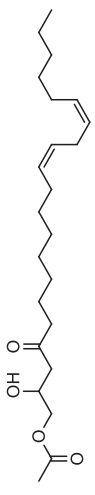
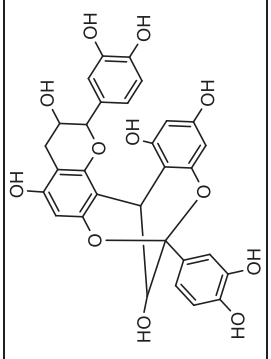
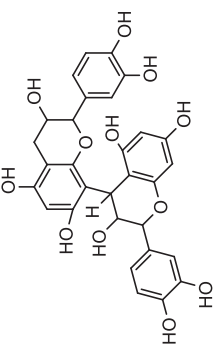
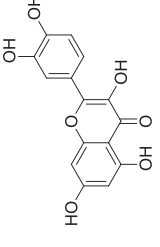
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
cinchonina		$C_{24}H_{20}O_9$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
crisina		$C_{15}H_{10}O_4$	polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
hidróxitirosol glicosídeo		$C_{14}H_{20}O_8$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
kaempferida		$C_{16}H_{12}O_6$	semente	álcool metílico 75 %	(RAMOS et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
kaempferol		$C_{15}H_{10}O_6$	semente	álcool metílico 75 %	(RAMOS et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
laricitrina (3'-o-metilmiricetina)		$C_{16}H_{12}O_8$	polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)

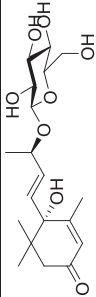
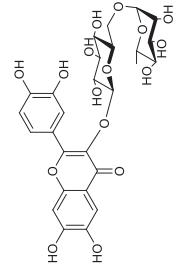
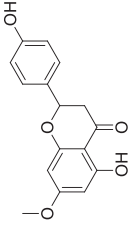
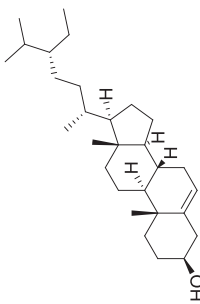
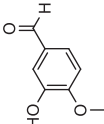
QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PARTES UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
naringenina		$C_{15}H_{12}O_5$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
pensternide		$C_{21}H_{32}O_{10}$	polpa, casca e semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
persedieno		$C_{21}H_{36}O_4$	semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			semente e casca	acetona	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
perseitol		$C_{71}H_{16}O_7$	caule, tronco, folhas e sementes	álcool etílico 80%	(LIU et al., 1999)
			polpa, casca e semente	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2013)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
persenona a		$C_{23}H_{38}O_4$	semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			polpa	hexano	(KAWAGISHI et al., 2001)
			polpa		(DOMERGUE et al., 2000)
			polpa	álcool metílico	(HASHIMURA et al., 2001)
			polpa, semente, casca	acetona	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
persenona b		$C_{21}H_{38}O_4$	semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			polpa	álcool metílico	(KIM; MURAKAMI; NAKAMURA; et al., 2000)
			polpa, semente, casca	acetona	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
persenona c		$C_{21}H_{36}O_4$	semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			polpa, semente, casca	acetona	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)

QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (continuação)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PARTES UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
persina		$C_{23}H_{40}O_4$	semente	acetona	(SANCHEZ et al., 2013)
			polpa	hexano	(KAWAGISHI et al., 2001)
			polpa	tolueno-éter etílico- ácido acético	(SAONA; MILLAR; TRUMBLE, 1998)
			polpa	álcool metílico	(HASHIMURA et al., 2001)
			polpa, semente, casca	acetona	(RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA, 2015)
procianidinas do tipo a		$C_{30}H_{24}O_{12}$	polpa	-----	(DOMERGUE et al., 2000)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
			casca	álcool etílico 80%	(KOSÍNSKA et al., 2012)
			semente	acetona:h ₂ O:ácido acético	(WANG; BOSTIC; GU, 2010)
procianidinas do tipo b dímero, trímero, tetramero, pentâmero		$C_{30}H_{26}O_{12}$	semente	acetona:h ₂ O:ácido acético	(WANG; BOSTIC; GU, 2010)
			semente	álcool metílico	(RAMOS-JERZ et al., 2013)
			semente	álcool etílico 80%	(TREMOCOLDI et al., 2018)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
			casca	álcool etílico 80%	(KOSÍNSKA et al., 2012)
quercetina		$C_{15}H_{10}O_7$	semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
			casca	-----	(KOSINSKA et al., 2012)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			casca	hexano e álcool metílico:h ₂ O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(POOVARODOM et al., 2010)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)

QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE (conclusão)

NOME DA SUBSTÂNCIA	FÓRMULA ESTRUTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	PORTE UTILIZADA	SOLVENTE EXTRATOR	REFERÊNCIA
roseosideo		$C_{21}H_{30}O_8$	folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
rutina		$C_{27}H_{30}O_{16}$	semente	álcool metílico 75%	(RAMOS et al., 2012)
			casca	hexano e álcool metílico: H_2O	(LÓPEZ-COBO et al., 2016)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)
			polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			folha	álcool etílico 35%	(CASTRO-LÓPEZ et al., 2019)
sakuranetina		$C_{16}H_{14}O_5$	casca	álcool etílico 80%	(KOSIŃSKA et al., 2012)
			semente	álcool etílico 50% (extrator acelerado por solvente)	(FIGUEROA et al., 2018)
β -sitosterol		$C_{28}H_{50}O$	polpa	álcool metílico	(LU et al., 2012)
vanilina		$C_8H_8O_3$	polpa	álcool metílico	(DI STEFANO et al., 2017)
			polpa	álcool metílico	(FERNANDEZ; PANCORBO; GUTIERREZ, 2011)

FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **autores que identificaram ácido clorogênico.

2.1.1 Constituintes fenólicos – atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Dentre os metabólitos secundários descritos em *P. americana* relatados na literatura (QUADRO 1), há descrito a presença de diferentes compostos fenólicos. Estes possuem vários grupos benzênicos com grupamentos hidroxilas como substituintes. Os fenóis naturais mais estudados são os flavonoides, que incluem diversas classes, entre eles os flavonóis, flavonas, flavan-3-ol (catequinas), flavanonas, antocianidinas e isoflavonas (SILVA et al., 2010).

A atividade destas substâncias como os ácidos fenólicos derivados do ácido hidróxibenzóico, procianidinas, catequina, entre outros, vem sendo investigada há algum tempo. Atualmente, estes compostos provenientes de plantas têm sido alvo de muitos estudos por seus notáveis efeitos promotores de saúde em doenças crônicas, relacionados ao poder de atuação como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete, apresentando atividades anticâncer, anti-inflamatória e antioxidante (SHAHIDI; YEO, 2018).

Em relação a capacidade de supressão da inflamação, pesquisas demonstram a atuação de compostos fenólicos na expressão de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral, de enzimas pró-inflamatórias, na expressão gênica relacionada à inflamação, inibição da transcrição de fatores nucleares como NF- κ B, poder inibitório de síntese de iNOS induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos, de ciclooxigenase e lipoxigenase, o que se traduz na inibição da produção de óxido nítrico, leucotrienos e citocina TNF- α (GONZÁLEZ et al., 2011; SHAHIDI; YEO, 2018).

Os compostos antioxidantes são aqueles capazes de impedir que biomoléculas sofram danos oxidativos por meio de reações mediadas por radicais livres, seja por inibição das reações oxidativas, por extinção direta de espécies reativas, inibição de enzimas ou pela capacidade de quelar íons metálicos (Fe³⁺, Cu⁺) (LEOPOLDINI et al., 2004). Sua atividade antioxidante parece estar relacionada à sua estrutura molecular, mais precisamente à presença e ao número de grupos hidroxila, e aos efeitos de ressonância (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

As sementes de *P. americana* apresentam alto teor de compostos fenólicos bem como conhecida atividade antioxidante (TORRES; MAU-LASTOVICKA; REZAAIYAN, 1987; SOONG; BARLOW, 2004; WANG; BOSTIC; GU, 2010; DAIUTO et al., 2014). No estudo de SOONG; BARLOW (2004), utilizaram os métodos TRAP

(potencial antioxidante total), FRAP (poder de redução do íon ferro), ABTS (2,20-azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e Folin–Ciocalteu, para concluir que as sementes apresentam maior atividade antioxidante e possuem maior teor de substâncias fenólicas, quando comparados as outras partes da planta. Através do método Folin-Ciocalteu, DAIUTO et al. (2014) mostraram que a casca e a semente da fruta possuem maior teor de compostos fenólicos quando comparados à polpa, apresentando respectivamente 63,5; 57,3 e 3,3 mg de ácido gálico equivalente por grama. Vale ressaltar que a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataque de patógenos, são fatores que podem interferir no conteúdo de compostos fenólicos e demais metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

Os dois principais fatores na pesquisa de produtos naturais são a separação e purificação dos constituintes bioativos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica analítica robusta, altamente eficiente, que proporciona separação analítica e é utilizada principalmente para análise qualitativa de compostos não voláteis, como fenólicos, alcaloides e terpenoides (KUMAR, 2017).

A análise qualitativa é avaliada com base na consistência do tempo de retenção dos padrões de referência e dos compostos da amostra analisada, através da interação diferencial dos componentes da matriz entre a fase móvel e a fase estacionária, bem como padrão de absorção no ultravioleta, a fluorescência ou padrão de fragmentação e relação m/z por exemplo (MALDANER; JARDIM, 2009). A seleção de fase móvel, coluna e detector depende do tipo e natureza dos compostos a serem separados.

A coluna é um componente importante da CLAE, pois contém as partículas usadas como fase estacionária que geralmente têm tamanho variando entre 3 e 50 μm com diâmetro de 2 a 5 mm. As colunas de fase reversa são amplamente utilizadas para a análise de múltiplos fito-constituintes (PATEL; PATEL; PATEL, 2012), como por exemplo a fase estacionária C18 à base de sílica que contém ligantes C18 alifáticos e silanóis livres (ZUVELA; SKOCZYLAS; JAY LIU, 2019).

Os detectores desempenham um papel importante na manutenção da precisão e estabilidade de amostras de plantas complexas sendo o componente

responsável por transformar um atributo físico ou químico em um sinal mensurável correspondente à concentração ou identidade. Muitos detectores, incluindo ultravioleta, detectores de arranjo fotodiodo, por fluorescência, evaporativo de espalhamento de luz, e por aerossol carregado são comercialmente disponíveis dependendo da aplicação (SWARTZ, 2010).

O detector de arranjo de diodos obtém o perfil espectral na região do ultravioleta de cada pico cromatográfico fornecendo informações estruturais sobre as substâncias. Os fenólicos são comumente detectados usando detectores de ultravioleta-visível (UV-VIS) e fotodiodo (DAD), visto que cada fenol exibe uma absorção maior ou menor da luz UV ou UV-VIS, de acordo com os cromóforos presentes (STALIKAS, 2010; SWARTZ, 2010; KUMAR, 2017).

Os flavonoides contêm dois anéis aromáticos em sua estrutura, o que confere absorção em UV. A detecção em 280 nm é o comprimento de onda mais utilizado para a separação simultânea de misturas de ácidos fenólicos. Sendo assim, a detecção de UV tornou-se a ferramenta preferida nas análises baseadas em CL e, ainda hoje, a CL com múltiplos comprimentos de onda ou DAD é a ferramenta predominante em estudos de triagem, quantificação e classificação provisória de subgrupos, entretanto sua deficiência está relacionada a não detecção de substâncias que não possuem cromóforos e consequentemente não absorvem a luz UV (STALIKAS, 2010; SWARTZ, 2010; KUMAR, 2017).

O princípio de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) é o mesmo da CLAE, porém as bombas em sistemas convencionais de CLAE atingem uma pressão de no máximo 400 bars enquanto as bombas em sistemas CLUE podem atingir pressões de 1000 bars, o que permite o uso de partículas menores ($<2,0\ \mu\text{m}$) e ainda produzir taxas de fluxo aceitáveis (até 5 ml/min). O uso de partículas menores permite obter melhor resolução (eficiência de separação), realizar uma cromatografia mais rápida e aumentar a sensibilidade. A eficiência é três vezes maior com partículas de $1,7\ \mu\text{m}$ em comparação com partículas de $5\ \mu\text{m}$, e a resolução é 70% maior do que com partículas de $5\ \mu\text{m}$. O comprimento da coluna com partículas de $1,7\ \mu\text{m}$ permite uma velocidade três vezes maior comparada a partículas de $5\ \mu\text{m}$ para a mesma eficiência, a taxa de fluxo pode ser três vezes maior e a sensibilidade aumenta porque menos espalhamento de banda ocorre durante a migração através de uma coluna com partículas menores. Isso significa que as separações podem ser nove vezes mais rápidas com resolução igual (ROGE et al., 2011).

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS.

Para a identificação de metabólitos secundários em extratos vegetais é recomendado a utilização de técnicas analíticas altamente sensíveis e seletivas, visto que estas substâncias se apresentam nas plantas normalmente em pouca quantidade, quimicamente diversificadas e em alta variabilidade ainda que na mesma espécie vegetal. Atualmente, o grande desafio no desenvolvimento de novos fitoterápicos baseia-se na busca e identificação destes compostos ativos devido ao potencial biológico que apresentam (GANZERA; STURM, 2018).

Visto que a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (EM) possibilita a identificação da massa molecular de compostos em baixas concentrações bem como informações estruturais a partir do perfil de fragmentação e abundância isotópica, esta técnica é amplamente selecionada para pesquisa de produtos naturais (KUMAR, 2017).

A EM é conhecida como uma técnica padrão na caracterização estrutural de substâncias, sendo composta por uma fonte de ionização, um analisador e um detector (STEINMANN; GANZERA, 2011). As moléculas introduzidas na fonte de ionização adquirem cargas positivas ou negativas e então são conduzidas pelo analisador e atingem o detector de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Os sinais gerados no detector são exibidos graficamente como um espectro de massas em que apresenta a abundância relativa dos sinais de acordo com sua relação m/z (HO et al., 2003).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI) é amplamente utilizada na análise de compostos naturais e dentre os analisadores destacam-se o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (*time-of-flight*, ToF), pois podem ser acoplados à cromatografia líquida (HO et al., 2003). Para se obter informações sobre a estrutura química da substância, e aumentar a sensibilidade e seletividade, utiliza-se o acoplamento de analisadores, conhecido como EM *tandem* (EM/EM), em que dois experimentos são realizados em sequência, onde os íons selecionados em um primeiro experimento são fragmentados no segundo, fornecendo então maiores informações estruturais, o que é muito aplicado a identificação e caracterização de compostos naturais (WU et al., 2013).

A escolha entre os tipos de analisadores depende do propósito da análise. Para as análises de identificação de produtos naturais e seus metabólitos é

recomendado a escolha de analisadores de alta resolução de massa. O Q-ToF é um exemplo, o qual pode atingir exatidão de massas em partes por milhão e também fornecer informações sobre a fragmentação dos íons sob investigação (KIND; FIEHN, 2010).

2.4 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um processo complexo e altamente controlado que tem como objetivo proteger o organismo de danos causados por estímulos endógenos ou exógenos e reparar o tecido lesado. O contato com patógenos e diversos agentes mecânicos e químicos desencadeia uma sequência de eventos envolvendo componentes vasculares, celulares e uma série de mediadores pró e anti-inflamatórios que atuam em conjunto, permitindo a destruição ou neutralização do estímulo agressor e a reparação tecidual (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2010). Quando ocorre um desequilíbrio nesse processo, a inflamação pode levar à destruição do tecido causando sua disfunção (CRUVINEL et al., 2010; DUNSTER, 2016).

Inicialmente, infecção ou dano tecidual desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, mediada pela ativação de macrófagos teciduais e mastócitos, com consequente produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas e eicosanoides (MEDZHITOV, 2008). O efeito inicial é a ativação do endotélio e a formação de um exsudato no local da agressão, composto por água, proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos). O contato com patógenos, ou com mediadores locais, liberados por leucócitos e células estromais residentes do tecido promove ativação dos neutrófilos visando à destruição do agente agressor e o recrutamento de células para a realização do reparo tecidual (NATHAN, 2002; 2006). Essa fase é caracterizada pela predominância de mediadores anti-inflamatórios (que são importantes para a transição da fase inflamatória para a fase de resolução) e mediada principalmente por macrófagos residentes do tecido e recrutados a partir da circulação (SERHAN; SAVILL, 2005; MEDZHITOV, 2008). Quando ocorre a persistência do estímulo e permanência do agente lesivo, ocorre a cronificação do processo inflamatório, que se caracteriza por mudança progressiva nos elementos celulares que infiltram o tecido. Os neutrófilos vão gradativamente sendo substituídos por macrófagos e linfócitos T (em caso da persistência do

patógeno), promovendo concomitantemente destruição e reparo tecidual com formação de granulomas e tecidos linfóides terciários (DRAYTON et al., 2006; CRUVINEL et al., 2010).

2.4.1 A participação dos macrófagos na inflamação

Os macrófagos são células que desempenham papel central em todas as etapas do processo inflamatório. A heterogeneidade dessas células reflete a existência de diversas subpopulações que apresentam funções distintas – algumas são importantes para a eliminação de um estímulo nocivo ao organismo e estabelecimento do processo inflamatório, enquanto outras contribuem para o reparo tecidual (DUNSTER, 2016). Uma variedade de estímulos é responsável pela ativação destas células, incluindo dano tecidual, produtos microbianos que são reconhecidos por receptores celulares, citocinas (p. ex., $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-4) e outros mediadores químicos secretados por linfócitos T sensibilizados, macrófagos e células estromais (MANTOVANI et al., 2013; DUNSTER, 2016). Quando os macrófagos são ativados, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) - como ânion superóxido, radical hidróxila e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) - e espécies reativas do nitrogênio (ERNs) - cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). Tanto EROs como ERNs são tóxicas ao agente agressor e as células do hospedeiro. Produtos microbianos e citocinas promovem a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, STAT 1 e IRF-1, que promovem a transcrição da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), ausente em macrófagos em repouso, levando à produção de NO (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007; BOGDAN, 2015). A ativação desses fatores de transcrição também resulta na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, $\text{TNF-}\alpha$ e IL10, quimiocinas (que promovem influxo de outros tipos celulares), fatores de crescimento (que induzem proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese) e outros mediadores da inflamação que atuam na eliminação do patógeno e iniciação de processo de reparo (CRUVINEL et al., 2010; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2010; MANTOVANI et al., 2013; DUNSTER, 2016).

Estímulos provenientes de infecção, lesão tecidual e mediadores secretados por células imunes ou estromais reprogramam a fisiologia dos macrófagos, levando ao aparecimento de diversos fenótipos funcionais (GORDON, 2007; MANTOVANI et al., 2013). A capacidade dos macrófagos em adquirir fenótipos e atividades

fisiológicas distintas ainda não está completamente elucidada, mas tem sido observada *in vitro*. A esta habilidade foi dado o nome de polarização, e baseado na expressão de seus marcadores de superfície celular, produção de mediadores específicos e função fisiológica, várias classes de macrófagos têm sido descritas em humanos e camundongos. Os dois estados de polarização melhor caracterizados são os fenótipos: classicamente ativados ou pró-inflamatórios (M1) e alternativamente ativados ou anti-inflamatórios (M2) (SICA et al., 2015; MURRAY, 2017; PATEL et al., 2017; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Macrófagos expostos à IFN- γ , TNF- α , ou lipopolissacarídeos (LPS) são polarizados para o tipo M1. Essa subpopulação apresenta atividade microbicida e tumoricida, secreta citocinas e mediadores pró-inflamatórios, assim como ânion superóxido, radicais de oxigênio e nitrogênio; no entanto, produzem baixas quantidades de IL-10. São componentes vitais de defesa do hospedeiro, porém as citocinas e mediadores gerados por estes podem levar a danos teciduais, sendo que sua ativação deve ser rigidamente controlada. Macrófagos expostos a IL-4 ou IL-13, complexos imunes, IL-10 e glicocorticoides são polarizados para o tipo M2 (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; DAVIES et al., 2013). Esta subpopulação possui grande capacidade de fagocitose e limpeza de restos celulares, além de promover reparo e cicatrização tecidual, produzindo IL-10 e fator de crescimento TGF- β em grande quantidade (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). O mecanismo regulatório anti-inflamatório dos macrófagos M2 protege o dano ao tecido inibindo a resposta inflamatória crônica (MANTOVANI et al., 2004; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Além disso, essa população possui subclassificações que dependem de sua resposta a diferentes estímulos (GOERDT; ORFANOS, 1999; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; BASHIR et al., 2016; USHIO et al., 2017; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Embora os macrófagos sejam essenciais para o controle efetivo de infecções, remoção de células mortas, promoção do reparo tecidual e cicatrização de feridas, os mediadores secretados por eles também contribuem para quadros patológicos e dano tecidual durante infecções e doenças inflamatórias, levando à considerável destruição quando inapropriamente ativados por fatores genéticos ou ambientais (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Estudos sugerem a modificação da função dos macrófagos como uma alternativa para diminuir a inflamação que contribui para a progressão de doenças

reumáticas, uma vez que estas células desempenham um papel fundamental por produzirem muitas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Estas foram identificadas como importantes mediadores e direcionadores de inflamação crônica e doenças autoimunes, além de apresentarem grande influência na destruição da cartilagem e do osso (BONDESON et al., 2006; LEBRE; TAK, 2010; LARIA et al., 2016; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

O aumento da concentração do NO no soro e líquido sinovial em articulações inflamadas em pacientes com artrite reumatoide (AR), osteoartrite (OA) e espondilite anquilosante, bem como correlação da atividade da NO sintase indutível em células mononucleares no sangue com a contagem de articulações dolorosas e inchadas em pacientes com artrite reumatoide, demonstram que o NO não é apenas um marcador dessas patologias, mas também um mediador pró-inflamatório de doenças autoimunes, sendo que o aumento de sua produção pode levar ao dano articular (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007).

Embora a etiologia das doenças autoimunes citadas acima não seja clara, acredita-se que a resposta imune exacerbada seja uma das principais causas de seu desenvolvimento, sendo os macrófagos células importantes na patogênese desses distúrbios (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Desta forma, o uso clínico de agentes que visam à modulação de macrófagos provavelmente será eficaz no tratamento destas doenças (KOH; DIPIETRO, 2011; DAGHESTANI; PIEPER; KRAUS, 2015; KRAUS et al., 2016; USHIO et al., 2017).

2.4.2 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA), também conhecida como osteoartrose, é a forma mais comum de doença articular e frequentemente confundida com a artrite reumatoide, mas diferem entre si quanto as causas e evolução. Este distúrbio é considerado como a maior fonte de dor e custo socioeconômico em todo o mundo, apresentando uma epidemiologia complexa e multifatorial, com componentes genéticos, biológicos e biomecânicos, além de fatores etiológicos específicos para articulações (GLYN-JONES et al., 2015).

A osteoartrite caracteriza-se por doença degenerativa crônica, cujas alterações são decorrentes de transtornos na renovação e degeneração da matriz cartilaginosa, ou seja, desequilíbrio da homeostase entre os agentes de catabolismo

e anabolismo, que leva à diminuição progressiva da espessura da cartilagem articular e comprometimento do osso subjacente (FILHO, 2011). Apesar de os mecanismos que levam a OA ainda não terem sido elucidados sabe-se que os condrócitos são o centro do processo, sendo a maior fonte de enzimas degradadoras, liberando proteases e óxido nítrico; as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF atuam na liberação dessas proteases (SEDA; SEDA, 2001).

2.4.2.1 Tratamento *on label*

No foco do tratamento da OA está a sobrecarga mecânica que leva à lesão articular e o ciclo inflamatório que perpetua essa lesão. Sendo assim, o tratamento baseia-se no autocuidado feito pelo paciente e no uso complementar de medicamentos.

Em relação à terapia medicamentosa utiliza-se fármacos analgésicos (DEAL et al., 1991), os AINES (MOORE et al., 1998; GRACE et al., 1999), AINES seletivos para COX-2, corticosteroides e ácido hialurônico (COIMBRA et al., 2004; SARZI-PUTTINI et al., 2005; ZHANG et al., 2010a; HOCHBERG et al., 2012), podendo estes serem usados via tópica, oral, intra-articulares e injetáveis.

Por sua vez, os nutracêuticos vêm ganhando espaço no tratamento das doenças articulares, visto que o uso dos fármacos atuais é frequentemente restringido devido aos efeitos adversos que apresentam. Embora os mecanismos de nutracêuticos no alívio da dor da OA não sejam bem compreendidos, estudos recentes começaram a identificar o mecanismo de ação de compostos que podem interagir em vários níveis da cascata inflamatória e com a produção de citocinas, que são mediadores da destruição da cartilagem, e também o foco de ação de compostos analgésicos (CHRUBASIK; ROUFOGALIS; CHRUBASIK, 2007; HENROTIN et al., 2011; WANG et al., 2018). Dentre os nutracêuticos como condroitina, glucosamina, diacereína, confrei (*Symphytum officinale*) e *Boswellia serrata* (GRUBE et al., 2007; CAMERON; CHRUBASIK, 2013; 2014; MOURA MDEL et al., 2016; WANG et al., 2018) destaca-se o medicamento composto por *Persea americana* e *Glycine max*, que tem sido frequentemente prescrito por reumatologistas. Alguns estudos indicam sua eficácia na melhora dos sintomas da OA (AU et al., 2007).

2.5 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

A quimiometria é um campo interdisciplinar que envolve estatística multivariada e utiliza ferramentas matemáticas para converter grande conjunto de dados em informações, como por exemplo: auxiliando em planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, entre outros. A quimiometria é uma análise discriminatória e basicamente classificada de acordo com a característica da avaliação: qualitativa (métodos de reconhecimento de padrões, não supervisionados e supervisionados) ou quantitativa (calibração multivariada) (GEMPERLINE, 2006; MARÇO et al., 2014).

Perfis cromatográficos de extratos vegetais apresentam uma matriz ampla, com grande número de variáveis, informações complexas e natureza multivariada, sendo assim as análises quimiométricas se apresentam como ferramentas úteis para explorar estes dados e estabelecer por exemplo critérios de similaridade e parâmetros de reconhecimento para perfis metabólicos (MARTINS; PEREIRA-FILHO; CASS, 2011; ZHANG et al., 2011; XIONG; YU; QU, 2014).

O perfil cromatográfico de uma droga vegetal é uma técnica analítica estabelecida que descreve a complexidade de uma amostra e pode ser adquirido por diversas técnicas, como CLAE, Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que podem fornecer uma variedade de informações. A análise de reconhecimento de padrões facilita o acesso a informações quando se deseja comparar tais dados complexos que seriam praticamente impossíveis de se relacionar sem empregar este tipo de ferramenta (GEMPERLINE, 2006).

A primeira análise exploratória de dados normalmente é do tipo não supervisionada como a de componentes principais (ACP), em que se constitui no reconhecimento de padrões sem assumir nenhum conhecimento prévio da amostra. A ACP além de ser uma ferramenta preditiva, também examina a variação intrínseca no conjunto de dados e fornece uma visão geral das variações entre os grupos (NIKAM et al., 2012; MELLO et al., 2017). Esta técnica possui como vantagens além da caracterização do perfil metabólico sem necessariamente identificar seus constituintes químicos, também a determinação de uma região discriminante cromatográfica. Os valores de escores demonstram o padrão de distribuição de amostras (informam similaridade ou não entre elas) e os gráficos de pesos mostram

as áreas dos cromatogramas e/ou os marcadores químicos que são significativos e contribuem para o agrupamento ou variação das amostras (GAD et al., 2013).

Após os dados experimentais serem organizados em forma de matriz, se necessário estes devem ser pré-tratados antes da análise quimiométrica ser aplicada, sendo um procedimento muito importante em qualquer análise. Vários métodos de pré-tratamento devem ser testados para garantir a escolha do mais adequado para utilização. O objetivo é reduzir as variações indesejáveis que não foram removidas durante a aquisição de dados e que podem influenciar os resultados finais. Entretanto, qualquer tipo de tratamento deve ser feito criteriosamente para não distorcer, comprometer ou inutilizar os resultados da análise. Há duas classes de pré-tratamentos um deles é aplicado as amostras, chamado transformação e o outro às variáveis chamado de pré-processamento (FERREIRA, 2015).

Desde a antiguidade, os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, têm sido consistentemente uma fonte importante de agentes terapêuticos e a especialização do Brasil nas áreas relacionadas ao desenvolvimento de fitoterápicos, incluindo química orgânica, farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica e ciências farmacêuticas, aumentou dramaticamente (CALIXTO, 2005). Sendo assim, a investigação etnofarmacológica em drogas vegetais exige correlação entre as áreas da ciência farmacêutica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos de *Persea americana* Mill. – Lauraceae foram coletados em Rosário do Ivaí – PR e Curitiba – PR (FIGURA 1) em setembro de 2017 (QUADRO 2). As exsicatas foram depositadas no Museu Botânico Municipal de Curitiba sob os números MBM 363120 e MBM 371877.

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, sob o número de cadastro A89CC92.

Após a coleta, as sementes de *P. americana* foram retiradas, limpas, cortadas e desidratadas em estufa de ar circulante a 40°C até massa constante. As sementes secas foram pulverizadas utilizando-se moinho de facas (Quimis®) e tamisadas (Bertel®) em pó grosso, semifino e finíssimo segundo a Farmacopeia Brasileira 5 edição (2010).

FIGURA 1 – SEMENTES DE ABACATE VERDE COLETADO EM CURITIBA-PR



FONTE: A autora (2019).

QUADRO 2 – AMOSTRAS COLETADAS DE *P. americana*

LOCAL	MATURAÇÃO	LEGENDA
Rosário do Ivaí - PR	14 sementes maduras	AL.m
	24 sementes verdes	AL.v
Curitiba - PR	20 sementes maduras	CWB. m
	46 sementes verdes	CWB. v

FONTE: A autora (2019).

3.1.1 Preparo dos extratos de *Persea americana* Mill.

Para o preparo dos extratos realizou-se maceração a frio, com agitação ocasional e sem renovação de líquido extrator, utilizando 0,5 g de droga vegetal pulverizada e 15 mL de álcool etílico (com teor alcoólico de acordo com a TABELA 1).

A partir do planejamento fatorial 2^3 (TABELA 1), os extratos foram preparados em diferentes condições quanto à granulometria do pó, teor alcoólico e tempo de extração, sendo este planejamento utilizado para as sementes verdes e maduras de ambos os locais de coleta. A maturação das amostras foi determinada em verde (consistência firme) e madura (7 dias após a coleta).

Após maceração estática, o extrato foi filtrado em papel filtro e submetido à evaporação em evaporador centrífugo CentriVap® (50 °C, 1700 rpm, 12 h, sob pressão reduzida), congelados em freezer à -40 °C e posteriormente liofilizados (liofilizador *Virtis Advantage Plus*, SP Scientific, Warminster, Inglaterra) a -80 °C, 100 mTorr, por 24 h.

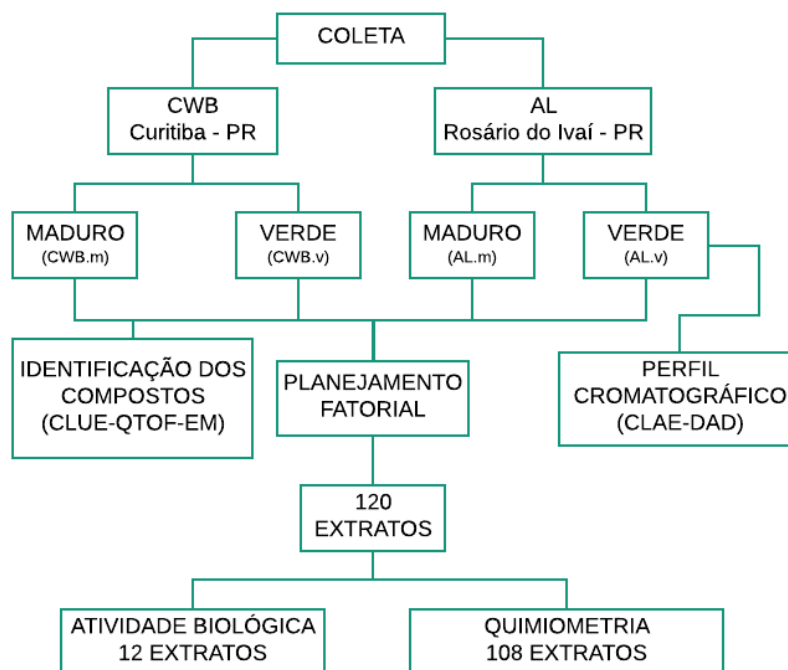
TABELA 1 – PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXTRAÇÃO

Dados do experimento				
		-	0	+
Fatores:	1: Grau alcoólico (%)	30	50	70
	2: Granulometria	FS	SF	G
	3: Tempo de extração (h)	24	72	168
Ensaio	1	2	3	
1	-	-	-	
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	
9	0	0	0	

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: FS (finíssimo); G (grosso); SF (semifino)

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DE DESENVOLVIMENTO



3.1.1.1 Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD.

Para verificar o perfil cromatográfico do extrato, inicialmente utilizou-se o extrato (9,06 mg/mL) da droga AL.v triturada em pó finíssimo em maceração por 24h em álcool etílico 30% (v/v). A amostra foi selecionada de acordo com a quantidade disponível para pesquisa, sendo esta a que apresentou maior rendimento em peso de semente. O extrato foi primeiramente filtrado em papel filtro e em seguida em filtro seringa PTFE 0,45 µm (Merck®). O filtrado foi analisado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Varian® - SYS LC 240, CA, EUA), com detector de arranjo de diodos (DAD) 335, com varredura de 200-800 nm, injeção automática, *software* Workstation, disponibilizado pela Central Analítica do Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas da UFPR. A separação cromatográfica foi realizada por coluna de fase reversa Kromasil® 100 C18 5 µm (4,6 x 250 mm), pré-coluna C18 (2,5 cm x 3 mm) e injeção de 25 µL. Foi utilizado um método em que a fase móvel consistiu de (A) água ultrapura e (B) álcool metílico (J.T. Baker, grau HPLC) (**Método I**) e posteriormente analisou-se a fase móvel (A) água ultrapura e (B) acetonitrila (ACN) (J.T. Baker, grau

HPLC) (**Método II**) ambos seguindo o gradiente: 0→60', 5→95% B; 60→70', 95% B; 70→72', 95→5% B; 72→92', 5% B; com fluxo de 0,50 mL/min à 25 °C.

A partir do método inicial realizou-se a otimização do gradiente, da composição da fase móvel e do preparo da amostra. A primeira otimização consistiu em macerar AL.v (pó finíssimo) em álcool etílico 70% (v/v) e em álcool etílico 30% (v/v). Os extratos foram filtrados em papel filtro e levados à secura sob pressão reduzida e temperatura 45°C. Os resíduos foram ressuspensos em acetonitrila e água na proporção 1:1 (v/v), na concentração de 10 mg/mL, centrifugado (10 rpm, 5 min), filtrado em filtro seringa PTFE 0,45 µm (Merck®) e injetado 25 µL em fluxo de 0,5 mL/min. Também foi analisada uma amostra de branco composta de acetonitrila:água ultrapura (1:1) a fim de verificar possível interferência do solvente de ressuspensão na absorção UV. Os métodos de otimização, com fase móvel (A) água ultrapura e (B) ACN, foram:

Método III: Alterou-se apenas o gradiente, para: 0'→60', 5→60% B; 60'→65', 60→95% B; 65'→70', 95% B; 70'→72', 95→5% B; 72→77', 5% B.

Método IV: Gradiente: 0'→60', 5→35% B; 60'→65', 5% B; 65'→70', 5% B.

Método V: Gradiente: 0'→30', 10→40% B; 30'→35', 40→10% B.

Método VI: Gradiente: 0'→25', 5→35% B; 25'→30', 35→5% B

Método VII: Gradiente: 0'→35', 5→40% B; 35'→40', 40→5% B.

Método VIII: Fase móvel (A) água ultrapura e (B) álcool metílico. Seguindo o gradiente do método I.

Método IX: Mantendo-se o álcool metílico como solvente B da fase móvel, analisou-se o extrato no gradiente: 0'→20', 5→20% B; 20'→21', 20→35% B; 21'→41', 35→55% B; 41'→43', 55→95% B; 43'→48', 95% B; 48'→63', 95→5% B.

Método X: Amostra diluída a 0,1 mg/mL, e fase móvel composta de A: água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e B: acetonitrila (0,1% ácido fórmico): 0'→5,05', 1% B; 5,05'→60,61', 1% → 100% B; 60,61→63,13', 100% B; 63,13'→68,18', 100→1% B; 68,18'→80,81', 1% B.

Otimizando a metodologia de preparo da amostra, o resíduo gerado na evaporação foi ressuspensado em álcool etílico 70% (v/v), na concentração de 10 mg/mL:

Método XI: Para este método, foi utilizada amostra diluída a concentração de 1,0 mg/mL e gradiente: A: água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e B: acetonitrila (0,1%

ácido fórmico), fluxo de 0,96 mL/min, gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→60', 1→100% B; 60'→62,5', 100% B; 62,5'→67,5', 100%→1% B; 67,5'→80', 1% B.

Para os métodos a seguir foi utilizada amostra na concentração de 10 mg/mL:

Método XII: Fase móvel = A: água ultrapura e B: acetonitrila, gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→16% B; 6'→16', 16→34% B; 16'→21', 34→73% B; 21'→36', 73→100% B; 36'→38,5', 100% B; 38,5'→41,5', 100→40% B; 41,5'→42', 40→1%.

Método XIII: Gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→23% B; 6'→12', 23→34% B; 12'→15', 34→82% B; 15'→25', 82→100% B; 25'→27,5', 100% B; 27,5'→30,5', 100→40% B; 30,5'→32', 40→1%.

Método XIV: Gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→16% B; 6'→10', 16→34% B; 10'→13', 34→73% B; 13'→23', 73→100% B; 23'→25,5', 100% B; 25,5'→28,5', 100→40% B; 28,5'→33', 40→1%.

Método XV: Conforme método XIV, porém com fluxo 0,70 mL/min.

Método XVI : Fluxo 0,65 mL/min. Gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→60% B; 6'→7', 60→82% B; 7'→17', 82→100% B; 17'→19,5', 100% B; 19,5'→20,5', 100→40% B; 20,5'→26', 40→1% B.

Método XVII: Gradiente: 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→34% B; 6'→12', 34→82% B; 12'→22', 82→100% B; 22'→24,5', 100% B; 24,5'→27,5', 100→40% B; 27,5'→32', 40→1% B.

Método XVIII: Gradiente: 0'→30', 5→34% B; 30'→36', 34→82% B; 36'→46', 82→100% B; 46'→48,5', 100% B; 48,5'→51', 100→40% B; 51'→55,5', 40→5% B.

Método XIX: Fluxo de 0,70 mL/min., gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→21', 29→58% B; 21'→24', 58→82% B; 24'→34', 82→100% B; 34'→36,5', 100% B; 36,5'→39', 100→40% B; 39'→43,5', 40→5% B; 43,5'→48', 5% B.

Método XX: Fluxo de 0,70 mL/min., gradiente: 0'→20', 1% B; 20'→21', 1→34% B; 21'→28', 34→82% B; 28'→38', 82→100% B; 38'→40', 100% B.

Método XXI: Fluxo de 0,60 mL/min., gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→26,6', 89→100% B; 26,6'→29,1', 100% B; 29,1'→31,6', 100→40% B; 31,6'→36,1', 40→5% B; 36,1'→40,6', 5% B.

Método XXII: Fluxo de 0,65 mL/min., gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→35,5', 89→100% B; 35,5'→45,5', 100% B; 45,5'→48', 100→40% B; 48'→58', 40→5% B; 58'→62', 5% B.

Método XXIII: Gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→25,5', 89→100% B; 25,5'→35,5', 100% B; 35,5'→36,5', 100→40% B; 36,5'→49,5', 40→5% B; 49,5'→54,5', 5% B.

Método XXIV: Gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→92% B; 20,5'→23,2', 92→100% B; 23,2'→33,2', 100% B; 33,2'→35,2', 100→40% B; 35,2'→47', 40→10% B; 47'→48', 10% B.

Método XXV: Fluxo de 0,7 mL/min., gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→92% B; 20,5'→30,5', 92→100% B; 30,5'→32,5', 100% B; 32,5'→50', 100→40% B; 50'→50,5', 40→10% B.

Método XXVI: Gradiente método XXV, (A) água ultrapura e (B) acetonitrila.

Método XXVII: (A) água ultrapura (ácido fórmico 0,1%) e (B) acetonitrila (ácido fórmico 0,1%), gradiente: 0'→20', 10→29% B; 20'→30', 29→100% B; 30'→45', 100% B; 45'→47', 100→40% B; 47'→64,5', 40→10% B; 64,5'→65', 10% B.

Os métodos a seguir foram analisados utilizando-se o mesmo gradiente do método anterior (XXVII):

Método XXVIII: (A) água ultrapura (0,1% ácido fosfórico) e (B) acetonitrila.

Método XXIX: (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, pH: 2,58.

Método XXX: (A) água ultrapura (0,1% ácido acético) e (B) acetonitrila, pH: 3,16.

Método XXXI: (A) água ultrapura e (B) acetonitrila, pH: 4,83.

Método XXXII: (A) água ultrapura (0,01% ácido trifluoroacético) e (B) acetonitrila, pH: 2,89.

Método XXXIII: (A) tampão formiato 10mM e (B) acetonitrila, pH: 2,85.

Método XXXIV: (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) álcool metílico, pH: 2,58.

3.1.1.2 Perfil cromatográfico e identificação de metabólitos secundários por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à espectrometria de massas-QToF.

Para análise dos extratos, o liofilizado das amostras AL.v, AL.m, CWB.v e CWB.m, em todas as condições do planejamento fatorial, foi ressuspendido em álcool etílico 70% (v/v), obtendo-se uma solução de 10,0 mg/mL. Para análise, esta solução foi diluída em acetonitrila até concentração de 1,0 mg/mL.

Para análise por CLUE-ESI-QToF-EM foi utilizado Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), quadrupolo-

tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA) com fonte de ionização por electrospray localizado no Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR e a separação cromatográfica realizada em coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 μm (2,1 x 100 mm), à 35 °C, em fluxo de 0,4 mL/min, à pressão de 140 atm com injeção de 3 μL . O tempo de aquisição dos dados utilizado foi de 14 minutos, com intervalo de massas em baixa energia de 100-1400 m/z e intervalo de massas em alta energia de 50-1400 m/z , energia de colisão em baixa energia em 6 V e energia de colisão em alta energia de 20-40 V.

Os parâmetros operacionais ajustados foram: voltagem do Capilar à 2,5 kV, voltagem do Cone à 40 V, *Source offset* à 80 V, fluxo gás do cone à 50 L/h, fluxo gás de dessolvatação à 500 L/h, temperatura da fonte à 150 °C, temperatura de dessolvatação à 450 °C. Como fase móvel utilizou-se (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico) seguindo o gradiente: 0'→1', 1% B; 1'→12', 1→100% B; 12'→12,5', 100% B; 12,5'→13,5', 100→1% B; 13,5'→16', 1% B.

Na análise cromatográfica, as massas adquiridas foram corrigidas por meio de *Locks*, composto por leucina encefalina na concentração de 1000 ng/mL e com fluxo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Como calibrante foi utilizado formiato de sódio 0,05 mM/L produzido a partir de hidróxido de sódio e ácido fórmico. Os dados obtidos foram processados por meio do *software* MassLynx V 4.1 da *Waters Corporation* (Milford, EUA) e foram adquiridos no modo centroide MS^e. Para identificação dos compostos foram utilizados os dados adquiridos das amostras na condição **(2)** do planejamento (álcool etílico 70% (v/v), pó finíssimo, 24h de maceração).

3.1.1.3 Pré-tratamento dos dados obtidos da análise por CLUE-ESI-QToF-EM.

Os cromatogramas obtidos pelo *software* MassLynx™ da *Waters Corporation* foram tratados através do *software* MarkerLynx™ XS Application Manager que processa os dados multivariados complexos de LC/MS, LC/MS/MS, GC/MS e GC/MS/MS para estudos de metabolômica.

Os parâmetros de alinhamento e de detecção dos picos das amostras no *software* MarkerLynx™ XS foram configuradas como descrito a seguir: *Analysis Type*: Tipo 1; *Initial and Final Retention Time*: 0-14 minutos; *Low and High Mass*: 50 a 1400 Da; *XIC Window* (Da): 0,05 Da; *Peak Width at 5% Height*: a largura foi fixada em 5% da altura do pico; *Peak-to-Peak Baseline Noise*: foi configurado em 10; *Apply*

Smoothing: ativado; *Marker Intensity threshold (counts)*: um valor padrão de 3×10^4 foi selecionado, de modo que os picos com intensidade inferior a este valor foram considerados como ruído; *Mass window*: utilizou-se uma tolerância de 0,05 Da; *Retention time window*: uma janela de 0,5 minutos foi utilizada para todas as análises; *Noise elimination level*: 100; *Deisotope data*: ativado.

3.1.1.4 Processamento dos biomarcadores identificados pelo software MarkerLynx™ XS através da análise de componentes principais.

Depois de processadas todas as amostras os dados foram exportados como matriz 106x586 (*software* Origin Pro 8). Os dados adquiridos foram transferidos e submetidos a análise por componentes principais (ACP), utilizando PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvetor Research) operado no *software* Matlab 7.0.1® (Mathworks). Realizou-se uma análise exploratória preliminar por análise de componentes principais (ACP) em que todos os tipos de pré-processamentos e números de componentes principais (CPs) foram avaliados, visando discriminar os conjuntos de amostras.

Para a realização da análise de componentes principais (ACP) utilizou-se o pré-processamento *Group Scale* e avaliou-se o gráfico de escores e os gráficos de pesos, resultantes da ACP.

3.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*.

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Paraná.

3.2.1 Cultura de células RAW 264.7.

A linhagem de células de macrófagos murinos, RAW 264.7 (ATCC®TIB71™), foi cultivada em meio RPMI 1460 (Gibco®) estéril, suplementado com 10% Soro Bovino Fetal (SBF), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e mantida a temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade.

3.2.1.1 Determinação da concentração de tratamento do extrato bruto pelo método de Redução do Sal de Tetrazólio (MTT).

Para a avaliação da modulação da função inflamatória de macrófagos, foram utilizados os extratos de *P. americana* AL.m, AL.v, CWB.v e CWB.m nas condições de extração (1), (8) e (9), ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração final de 100 mg/mL). A concentração utilizada para tratamento das células RAW 264.7, a fim de se analisar a produção de óxido nítrico e citocinas, foi determinada através de ensaio de citotoxicidade utilizando-se o sal de MTT (brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) baseado na metodologia descrita por MOSMANN (1983). Este se baseia na redução do MTT a um composto insolúvel e de cor púrpura – a formazana - por enzimas mitocondriais. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^5 células/poço e mantidas em temperatura de 37 °C e 95% de umidade durante 4 horas para adesão. Após este período, as células foram tratadas, ou não, com os extratos nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1 mg/mL, sendo mantidas em temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade durante o período de 24 h. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o sal MTT (Sigma®) de acordo com as instruções do fabricante. Os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato (PBS pH 7,4) sendo adicionados 100 µL/poço de MTT (concentração final 0,5 mg/mL em cada poço). Após 2 horas de incubação em temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram mantidas sob agitação durante 5 minutos e a absorbância foi lida em leitora de microplaca a 540 nm. A viabilidade celular das células tratadas com as diversas concentrações dos extratos foi determinada em comparação às células não tratadas, sendo que a viabilidade destas foi considerada 100%. A partir dos resultados obtidos, foi escolhida para a avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas a maior concentração que apresentou a menor citotoxicidade (viabilidade maior que 90%) e induziu menos alterações morfológicas nas células. O experimento foi realizado em triplicata e repetidos independentes por três vezes.

3.2.1.2 Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7).

Células RAW 264.7, cultivadas em meio RPMI (Gibco®) estéril, contendo 10% SBF e antibiótico, tiveram sua viabilidade avaliada em câmara de Neubauer utilizando-se o teste de exclusão de azul de tripan 0,1%, sendo posteriormente plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas durante 4 horas, na temperatura de 37 °C, e atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade. Após este período, as células foram cultivadas com os extratos, na concentração determinada por meio do ensaio de citotoxicidade com MTT, na presença ou ausência de 2,5 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich®), durante 24 horas, na temperatura de 37 °C, e atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade. O sobrenadante coletado ao final deste período foi utilizado para a determinação da concentração de óxido nítrico utilizando-se a metodologia de GRIESS (1879). Por meio deste método, todo o óxido nítrico é convertido a nitrito, sendo esta a espécie detectada colorimetricamente. Soluções de sulfanilamida em H₃PO₄ 1% (m/v) e *N*-1-naftiletilenodiamina 0,1% (m/v) diluída em água deionizada foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) para obtenção do reagente de Griess. Volumes iguais de sobrenadante de cultura e reagente de Griess foram misturados em placas de 96 poços, sendo efetuada a leitura da absorbância em leitor de microplaca em 550 nm. As concentrações de nitrito no sobrenadante foram determinadas pela medida comparativa com uma curva padrão de nitrito de sódio com concentrações variando de 2,5 µM até 40 µM. O experimento foi realizado em triplicata e repetidos independentes por três vezes.

3.2.1.3 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

O sobrenadante das células RAW 264.7 obtido de acordo com o item 3.2.1.2 foi também utilizado para a determinação da produção das citocinas IL-6, KC e IL-10 por imunoenaios colorimétricos do tipo ELISA sanduíche disponíveis comercialmente (kits DuoSet, R&D System®), de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi realizado em triplicata e repetidos independentes por três vezes.

3.2.1.4 Análises estatísticas

As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Tukey, considerando significantes resultados com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Popularmente para o preparo do extrato do abacate para aplicação através de fricções no local desejado, adiciona-se uma unidade de semente de abacate em um litro de álcool etílico (GRANDI, 2014). Sendo assim, para reprodução em escala laboratorial calculou-se peso médio de uma semente (34,23 g) e a proporção de solvente, resultando na quantidade de material utilizado na extração: 0,5 g de droga vegetal pulverizada e 15 mL de álcool etílico.

4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

A TABELA 2 apresenta o rendimento dos extratos produzidos a partir do planejamento fatorial. Os extratos das amostras AL.v e AL.m apresentaram rendimentos menores variando de 11,54% a 17,52% e 13,81% a 16,82% respectivamente, e os extratos das amostras CWB.v e CWB.m apresentaram os maiores rendimentos variando de 21,89% a 33,33% e 13,70% a 20,30% respectivamente. Os extratos das amostras de Rosário do Ivaí (AL) apresentaram menor rendimento na condição **(4)** de extração (EtOH 70% (v/v), pó grosso, 24h) e maior rendimento na condição **(9)** (EtOH 50% (v/v), pó semifino, 72h), enquanto as amostras provenientes de Curitiba apresentaram seu maior rendimento na condição **(8)** (EtOH 70% (v/v), pó grosso, 168h). A diferença encontrada no rendimento dos extratos é um indicativo de que as variáveis consideradas no planejamento fatorial influenciaram na extração das sementes.

TABELA 2 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS AL.V, AL.M, CWB.V E CWB.M

Amostra/condição	Rendimento (%)				Média	DP (±)	Amostra/condição	Rendimento (%)				Média	DP (±)
	A	B	C	D				A	B	C	D		
AL.v							CWB.v						
1	17,84	16,96	16,40	15,47	16,67	0,99	1	22,06	20,19	22,99	22,31	21,89	1,20
2	17,95	17,80	15,20	16,79	16,94	1,27	2	26,25	23,73	31,59	20,61	25,54	4,65
3	16,24	15,86	15,72		15,94	0,27	3	30,99	34,49	27,63		31,04	3,43
4	12,03	12,07	10,52		11,54	0,89	4	28,51	28,53	34,44		30,49	3,42
5	15,66	15,63	15,18		15,49	0,27	5	20,72	18,75	38,27		25,91	10,75
6	16,66	17,95	17,88		17,50	0,73	6	31,74	32,56	26,89		30,39	3,06
7	13,85	16,40	14,68		14,98	1,30	7	26,64	30,55	27,09		28,09	2,14
8	16,35	13,53	11,50	8,25	12,41	3,41	8	38,21	31,79	32,27	31,05	33,33	3,29
9	14,31	17,05	16,09	22,64	17,52	3,59	9	34,24	33,62	*	30,36	32,74	2,08
AL.m							CWB.m						
1	15,90	17,45	17,65	14,94	16,49	1,29	1	16,46	18,62	14,00	16,97	16,51	1,91
2	17,56	14,70	15,58	16,40	16,06	1,22	2	17,92	18,51	18,03	16,44	17,72	0,90
3	15,62	15,33	16,08		15,68	0,38	3	15,69	14,12	15,37		15,06	0,83
4	13,74	14,76	12,92		13,81	0,92	4	16,30	13,48	11,33		13,70	2,49
5	14,17	15,37	14,13		14,56	0,71	5	19,08	17,31	16,26		17,55	1,43
6	16,19	14,91	18,37		16,49	1,75	6	19,85	16,23	18,08		18,05	1,81
7	15,59	15,39	16,77		15,91	0,74	7	15,56	10,00	16,03		13,86	3,35
8	15,12	15,26	16,03	15,53	15,49	0,40	8	19,12	19,82	17,05	25,24	20,30	3,49
9	16,99	17,55	15,45	17,29	16,82	0,94	9	18,20	19,68	19,92	22,63	20,11	1,84

FONTE: A autora (2019).

NOTAS: AL.v (Rosário do Ivaí, imaturas), AL.m (Rosário do Ivaí, maduras), CWB.v (Curitiba, imaturas), CWB.m (Curitiba, maduras). As letras A, B, C e D referem-se as replicatas realizadas.

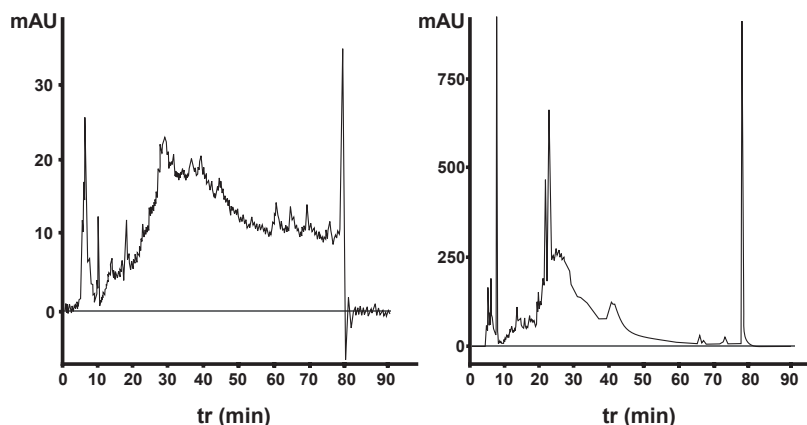
4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO E PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – DAD.

O perfil cromatográfico de um extrato de droga vegetal é sua “impressão digital”. Desta forma, a determinação da identidade de um extrato é fundamental para evitar fraudes e comprovar a autenticidade de produtos com fins terapêuticos que utilizem o mesmo; além de servir como padrão de comparação para futuros estudos. O controle de qualidade de preparados fitoterápicos em escala industrial exigido pela ANVISA inclui técnicas analíticas como o CLAE-DAD que possibilita a identificação do perfil cromatográfico, a fim de garantir a constância na composição de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ANVISA, 2010).

A obtenção do perfil cromatográfico foi realizada com a amostra AL.v (amostra de maior quantidade de coleta) em que o extrato foi preparado em álcool etílico 70% e 30% (v/v), com a amostra cujo tamanho de partícula determinado foi pó finíssimo, sob maceração por 24 horas (FIGURAS 3 e 4). Inicialmente, para o desenvolvimento e otimização do método por CLAE-DAD foram testadas fases móveis compostas por água ultrapura e acetonitrila e água ultrapura e álcool metílico. A partir de um levantamento bibliográfico de substâncias já identificadas em *Persea americana* (QUADRO 1 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS EM DIFERENTES PARTES DE *Persea americana* MILL.- LAURACEAE) notou-se a presença em grande quantidade de substâncias que apresentam poucos cromóforos em suas estruturas e consequentemente baixa absorção no UV, sendo assim a otimização do método seguiu utilizando-se acetonitrila como fase móvel (B), visto que álcool metílico apresenta absorção em 205 nm, podendo causar interferência na detecção das substâncias que poderiam apresentar absorção em comprimentos de onda próximo a este.

A otimização de método por CLAE é eficiente, financeiramente mais viável e atualmente a mais utilizada por indústrias e laboratórios de pesquisa, devido ao seu menor custo e aos métodos de controle de qualidade de drogas vegetais, princípios ativos e insumos farmacêuticos requeridos nas farmacopeias brasileira e internacionais que utilizam esta técnica analítica (KUPIEC, 2004; ANVISA, 2010; HASSAN, 2012).

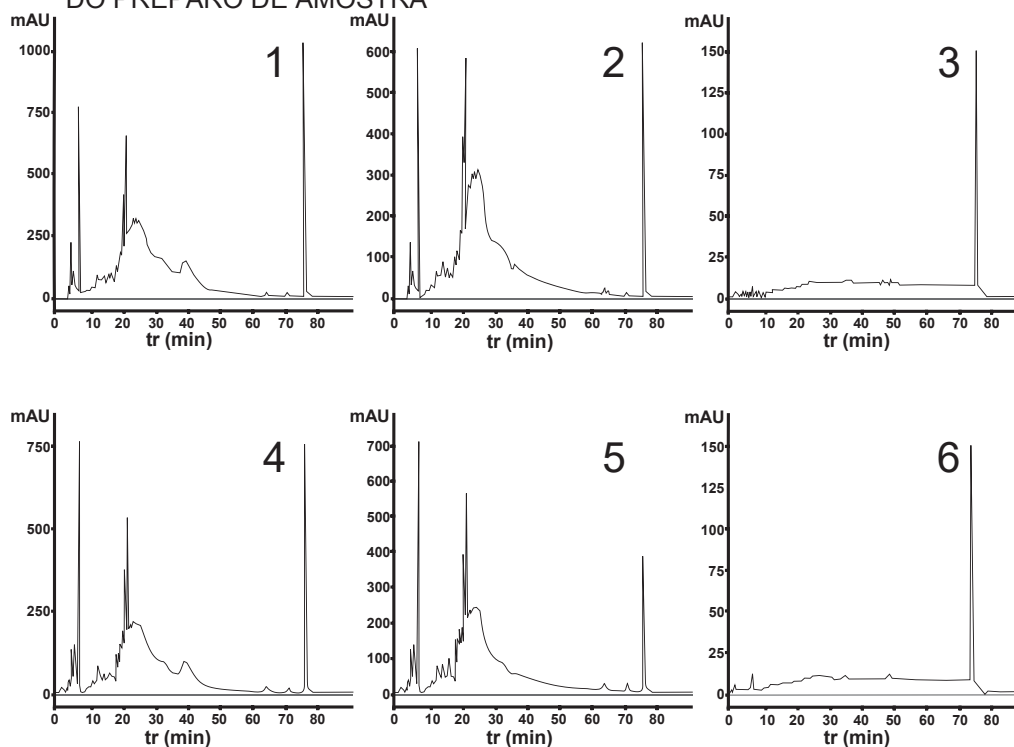
FIGURA 3 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS I E II, AMOSTRA AL.V (EM ALCÓOL ETÍLICO 30%, (V/V)), LEITURA EM 269 nm



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **Método I:** (A) água ultrapura e (B) álcool metílico, **Método II:** (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: ambos seguindo o gradiente: 0→60', 5→95% B; 60→70', 95% B; 70→72', 95→5% B; 72→92', 5% B; com fluxo de 0,50 mL/min à 25 °C.

FIGURA 4 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO II COM OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: AL.v em álcool etílico 30% (1 e 4) e 70% (v/v) (2 e 5), amostra branco (3 e 6), leitura em 260 nm (1, 2 e 3) e 269 nm (4, 5 e 6).

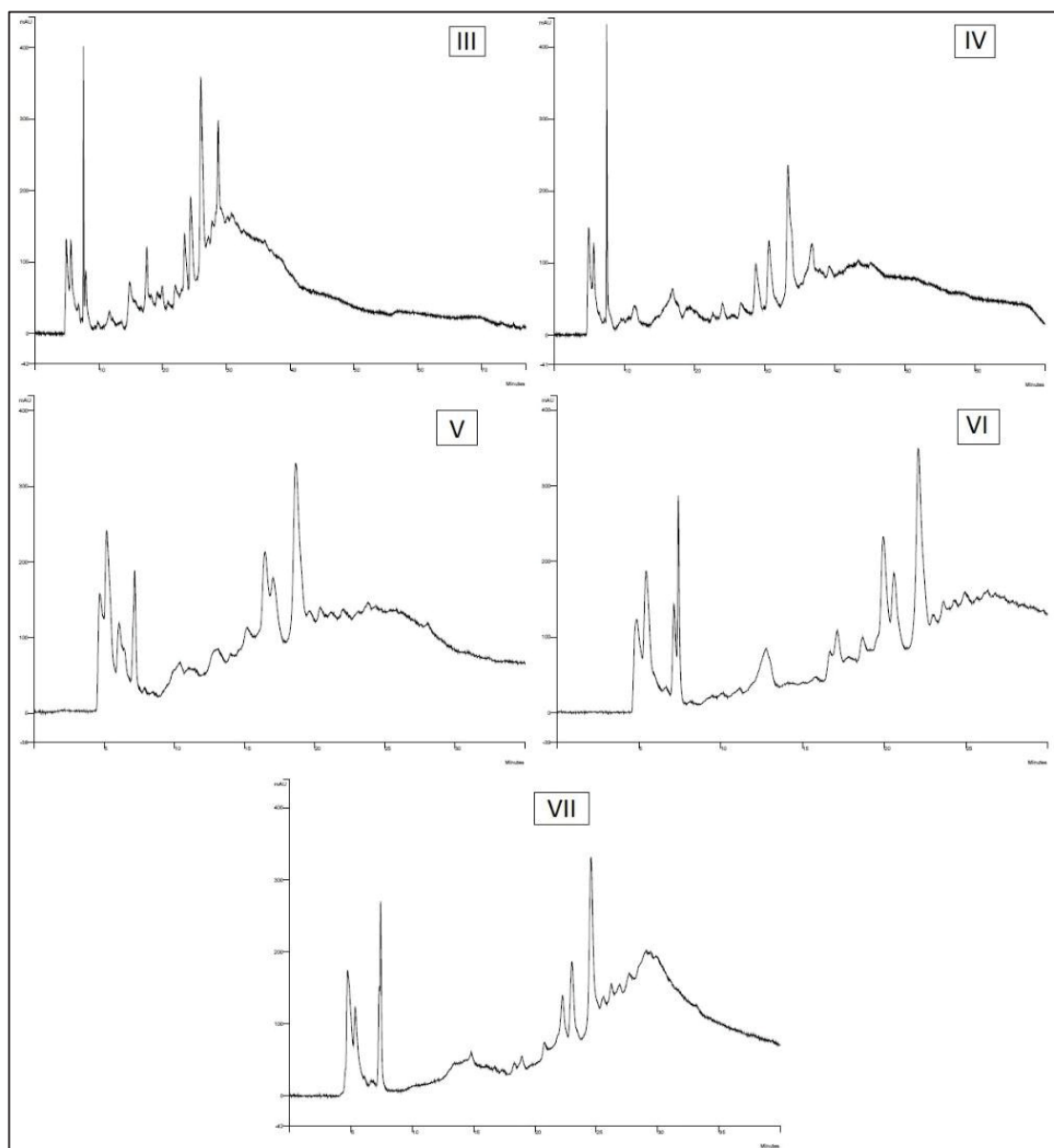
NOTAS: **Método II:** (A) água ultrapura e (B) acetonitrila: 0→60', 5→95% B; 60→70', 95% B; 70→72', 95→5% B; 72→92', 5% B; com fluxo de 0,50 mL/min à 25 °C.

Para a determinação de melhor comprimento de onda para detecção das substâncias dos extratos nas análises posteriores, foi utilizado o *software PolyView 2000 Spectral Procesing*, Aurora, em que é possível observar os comprimentos de onda que apresentam um perfil com maior número de picos e com maiores intensidades (≥ 100 mAU).

Abaixo encontram-se os cromatogramas (FIGURAS 5 a 10) referentes aos métodos de otimização, que foram realizados com o objetivo de se obter um perfil cromatográfico do extrato, no menor tempo de análise possível e com melhor resolução dos picos, para assim tornar-se uma ferramenta útil de comparação.

O desenvolvimento do gradiente iniciou-se calculando-se a concentração de fase móvel em que cada pico foi detectado no **método II**, levando também em consideração o tempo morto da coluna cromatográfica. Sendo assim, os métodos seguintes basearam-se em modificações do fluxo, da proporção do gradiente da fase móvel.

FIGURA 5 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS III, IV, V, VI e VII, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm

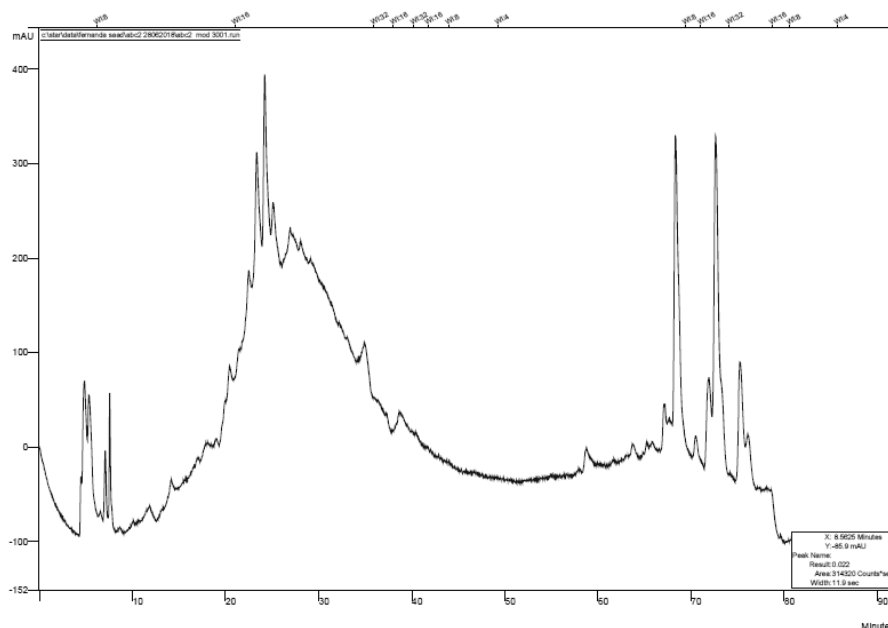


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Eixo Y: -40 a 400 mAU; Eixo X: tempo de retenção em minutos.

NOTAS: (A) água ultrapura e (B) ACN, **Método III**: Alterou-se apenas o gradiente, para: 0'→60', 5→60% B; 60'→65', 60→95% B; 65'→70', 95% B; 70'→72', 95→5% B; 72'→77', 5% B. **Método IV**: Gradiente: 0'→60', 5→35% B; 60'→65', 5% B; 65'→70', 5% B. **Método V**: Gradiente: 0'→30', 10→40% B; 30'→35', 40→10% B. **Método VI**: Gradiente: 0'→25', 5→35% B; 25'→30', 35→5% B. **Método VII**: Gradiente: 0'→35', 5→40% B; 35'→40', 40→5% B.

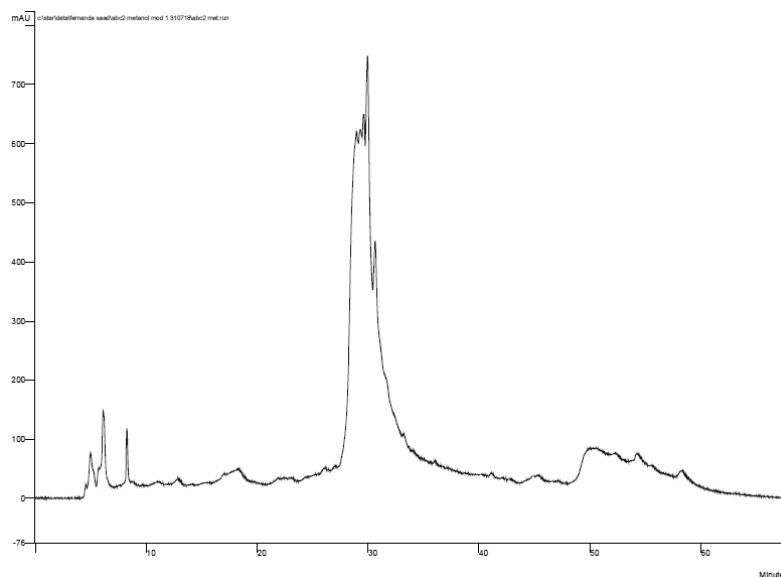
FIGURA 6 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO VIII, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm.



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **Método VIII:** (A) água ultrapura e (B) álcool metílico, 0→60', 5→95% B; 60→70', 95% B; 70→72', 95→5% B; 72→92', 5% B;

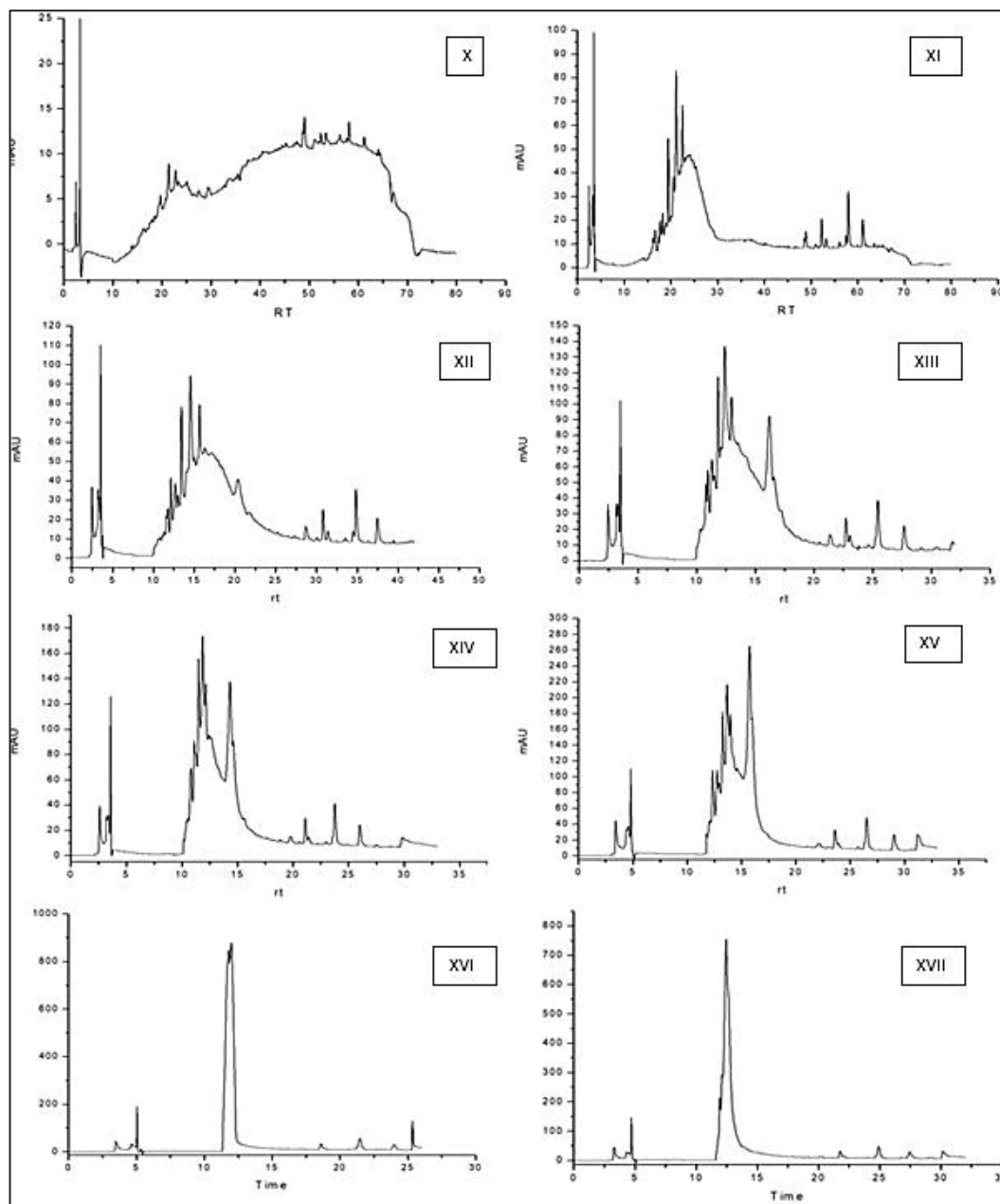
FIGURA 7 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO IX, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 269 nm.



FONTE: A autora (2019).

Notas: (A) água ultrapura e (B) álcool metílico, 0'→20', 5→20% B; 20'→21', 20→35% B; 21'→41', 35→55% B; 41'→43', 55→95% B; 43'→48', 95% B; 48'→63', 95→5% B.

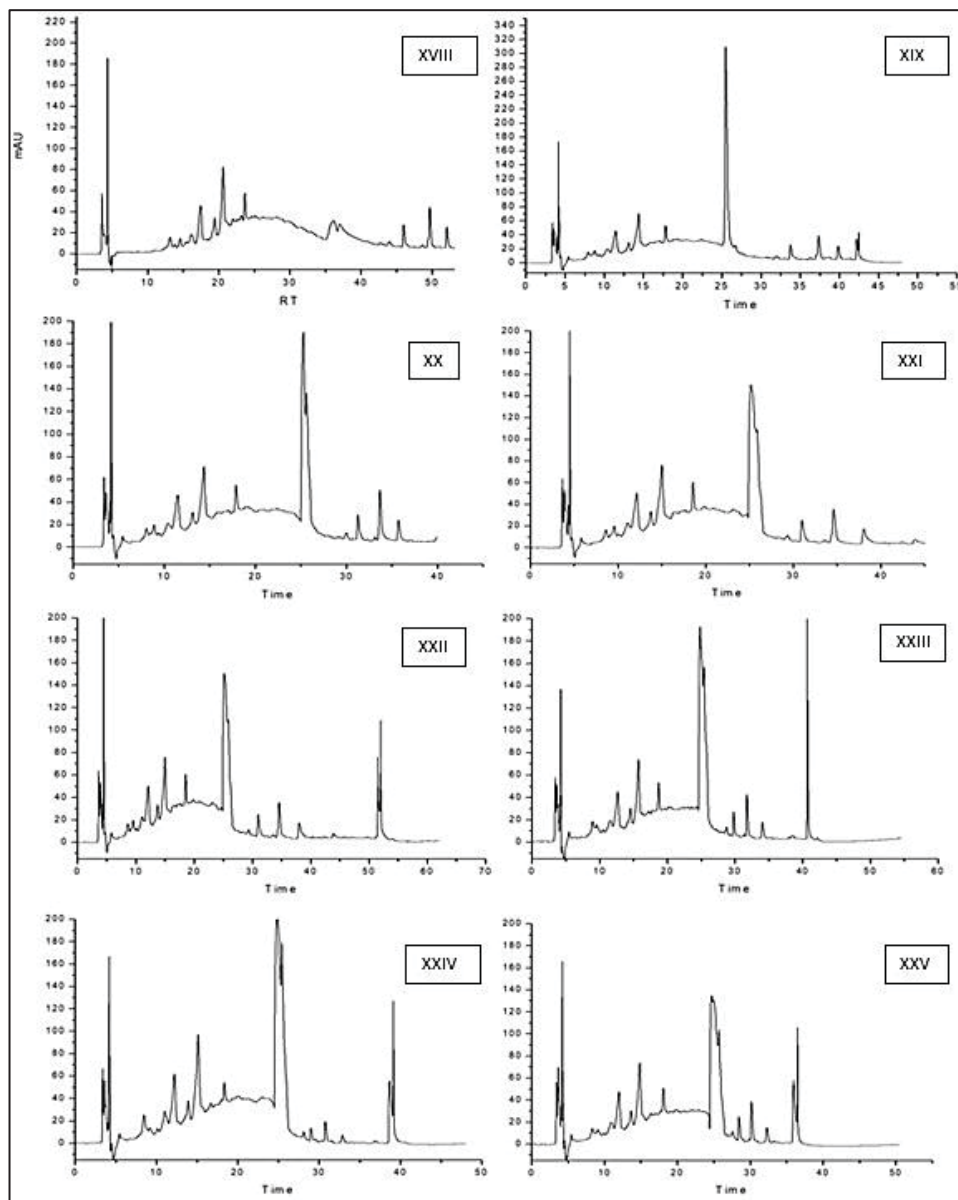
FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODOS X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI E XVII, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% (V/V)), LEITURA EM 260 nm



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **Método X:** Amostra 0,1 mg/mL, (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico): 0'→5,05', 1% B; 5,05'→60,61', 1% → 100% B; 60,61'→63,13', 100% B; 63,13'→68,18', 100% B; 68,18'→80,81', 1% B. **Método XI:** amostra 1,0 mg/mL (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico), fluxo de 0,96 mL/min, 0'→5', 1% B; 5'→60', 1→100% B; 60'→62,5', 100% B; 62,5'→67,5', 100%→1% B; 67,5'→80', 1% B. Amostra 10 mg/mL: **Método XII:** (A) água ultrapura e (B) acetonitrila, 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→16% B; 6'→16', 16→34% B; 16'→21', 34→73% B; 21'→36', 73→100% B; 36'→38,5', 100% B; 38,5'→41,5', 100→40% B; 41,5'→42', 40→1%. **Método XIII:** 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→23% B; 6'→12', 23→34% B; 12'→15', 34→82% B; 15'→25', 82→100% B; 25'→27,5', 100% B; 27,5'→30,5', 100→40% B; 30,5'→32', 40→1%. **Método XIV:** 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→16% B; 6'→10', 16→34% B; 10'→13', 34→73% B; 13'→23', 73→100% B; 23'→25,5', 100% B; 25,5'→28,5', 100→40% B; 28,5'→33', 40→1%. **Método XV:** Conforme método XIV, porém com fluxo 0,70 mL/min. **Método XVI:** Fluxo 0,65 mL/min, 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→60% B; 6'→7', 60→82% B; 7'→17', 82→100% B; 17'→19,5', 100% B; 19,5'→20,5', 100→40% B; 20,5'→26', 40→1%. **Método XVII:** 0'→5', 1% B; 5'→6', 1→34% B; 6'→12', 34→82% B; 12'→22', 82→100% B; 22'→24,5', 100% B; 24,5'→27,5', 100→40% B; 27,5'→32', 40→1% B.

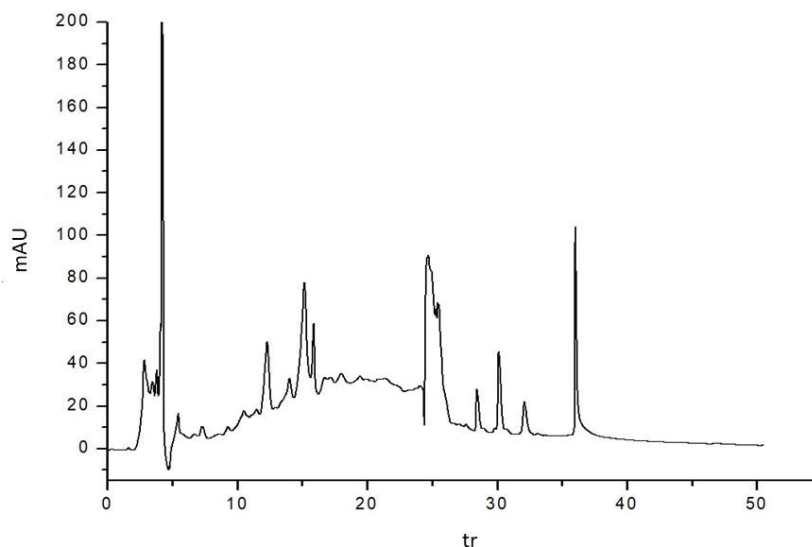
FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD , MÉTODOS XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV E XXV, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% V/V), LEITURA EM 260 nm



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **Método XVIII:** Fluxo 0,65mL/min, 0'→30', 5→34% B; 30'→36', 34→82% B; 36'→46', 82→100% B; 46'→48,5', 100% B; 48,5'→51', 100→40% B; 51'→55,5', 40→5% B. **Método XIX:** Fluxo de 0,70 mL/min, 0'→20', 10→29% B; 20'→21', 29→58% B; 21'→24', 58→82% B; 24'→34', 82→100% B; 34'→36,5', 100% B; 36,5'→39', 100→40% B, 39'→43,5', 40→5% B; 43,5'→48', 5% B. **Método XX:** 0'→20', 1% B; 20'→21', 1→34% B; 21'→28', 34→82% B; 28'→38', 82→100% B; 38'→40', 100% B. **Método XXI:** Fluxo de 0,60 mL/min., 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→26,6', 89→100% B; 26,6'→29,1', 100% B; 29,1'→31,6', 100→40% B; 31,6'→36,1', 40→5% B; 36,1'→40,6', 5% B. **Método XXII:** Fluxo de 0,65 mL/min., 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→35,5', 89→100% B; 35,5'→45,5', 100% B; 45,5'→48', 100→40% B; 48'→58', 40→5% B; 58'→62', 5% B. **Método XXIII:** 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→89% B; 20,5'→25,5', 89→100% B; 25,5'→35,5', 100% B; 35,5'→36,5', 100→40% B; 36,5'→49,5', 40→5% B; 49,5'→54,5', 5% B. **Método XXIV:** 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→92% B; 20,5'→23,2', 92→100% B; 23,2'→33,2', 100% B; 33,2'→35,2', 100→40% B; 35,2'→47', 40→10% B; 47'→48', 10% B. **Método XXV:** Fluxo de 0,7 mL/min., 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→92% B; 20,5'→30,5', 92→100% B; 30,5'→32,5', 100% B; 32,5'→50', 100→40% B; 50'→50,5', 40→10% B.

FIGURA 10 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, MÉTODO XXVI, AMOSTRA AL.V (EM ÁLCOOL ETÍLICO 70% V/V), LEITURA EM 260 nm

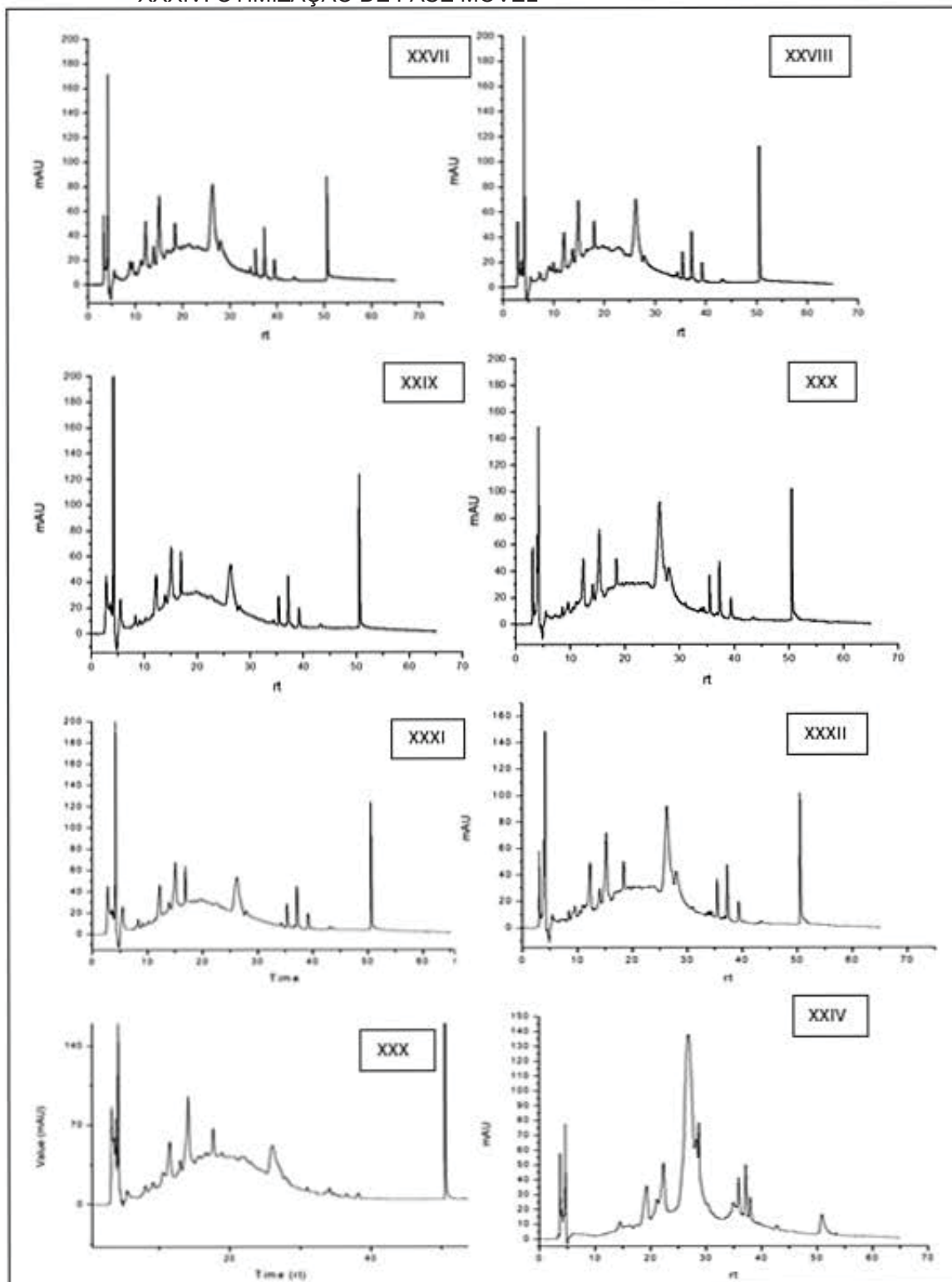


FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **Método XXVI:** (A) água ultrapura e (B) acetonitrila, fluxo de 0,7 mL/min., 0'→20', 10→29% B; 20'→20,5', 29→92% B; 20,5'→30,5', 92→100% B; 30,5'→32,5', 100% B; 32,5'→50', 100→40% B; 50'→50,5', 40→10% B.

Após diversas tentativas para desenvolvimento do método gradiente, considerando o método **XXVII** como o melhor, foram testados diferentes pH da fase móvel a fim de verificar possível ionização das substâncias bem como diminuição do efeito de cauda nos picos cromatográficos (FIGURA 111) (WICZLING; KUBIK; KALISZAN, 2015).

FIGURA 11 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, DA AMOSTRA AL.v, LEITURA EM 269 nm. MÉTODOS XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII E XXXIV. OTIMIZAÇÃO DE FASE MÓVEL

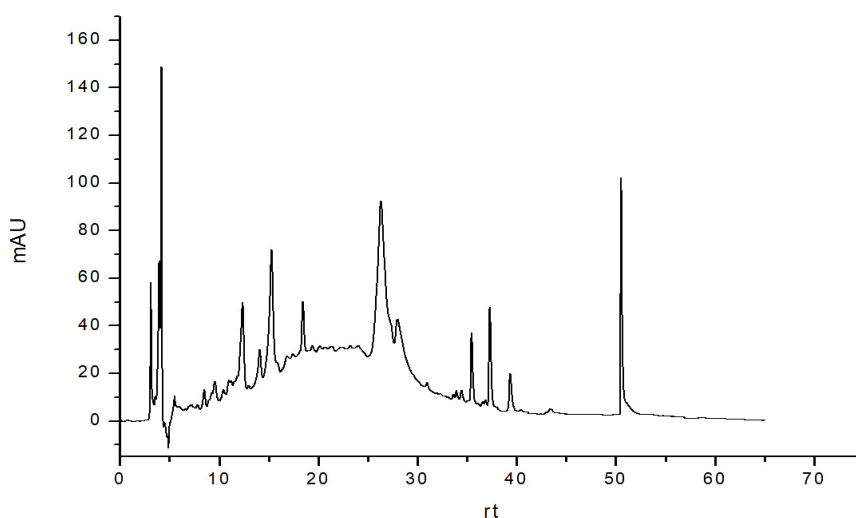


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: **XXVII:** (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico); **XXVIII:** (A) água ultrapura (0,1% ácido fosfórico) e (B) acetonitrila; **XXIX:** (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila; **XXX:** (A) água ultrapura (0,1% ácido acético) e (B) acetonitrila; **XXXI:** (A) água ultrapura e (B) acetonitrila; **XXXII:** (A) água ultrapura (0,01% TFA) e (B) acetonitrila; **XXXIII:** (A) Tampão formiato 10mM e (B) acetonitrila; **XXXIV:** (A) água ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) álcool metílico.

O método gradiente que apresentou maior número de picos cromatográficos, com melhor separação, melhor simetria e maior intensidade foi o **Método XXXII**: (A) água ultrapura (0,01% ácido trifluoroacético) e (B) acetonitrila, pH 2,89, gradiente 0'→20', 10→29% B; 20'→30', 29→100% B; 30'→45', 100% B; 45'→47', 100→40% B; 47'→64,5', 40→10% B; 64,5'→65', 10% B (FIGURA 12).

FIGURA 12 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD, DA AMOSTRA AL.V, EM 269 nm, MÉTODO XXXII



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: (A) água ultrapura (0,01% ácido trifluoroacético) e (B) acetonitrila, pH: 2,89.
0'→20', 10→29% B; 20'→30', 29→100% B; 30'→45', 100% B; 45'→47', 100→40% B; 47'→64,5',
40→10% B; 64,5'→65', 10% B.

Atualmente, a farmacopeia brasileira e as farmacopeias internacionais trazem como métodos de confirmação de qualidade de uma droga vegetal o perfil cromatográfico desta desenvolvido por cromatografia em camada delgada bem como cromatografia líquida de alta eficiência (LAZAROWYCH; PEKOS, 1998; WANG et al., 2012). O desenvolvimento de um método capaz de identificar a autenticidade de uma droga vegetal, evita a adulteração e contaminação de formulações produzidos a partir desta droga vegetal, seja por outras espécies, por espécies provenientes de outras localidades que podem não apresentar a mesma atividade biológica, ou por outras plantas que podem ser tóxicas por exemplo (ANUSAK; THITIMA; ITHARAT, 2007; KHARYUK et al., 2018).

Neste sentido, a partir deste perfil cromatográfico obtido, é possível identificar os picos cromatográficos com a utilização de padrões de referência, ou através da reprodução do **Método XXXII** em um equipamento de CLAE-DAD acoplado à

espectrômetro de massas, e então ser utilizado como método de controle de qualidade de extratos hidroalcoólicos de sementes de *P. americana* Mill., e também para controle de estabilidade da droga vegetal e de suas formulações, após a validação deste.

Com a ajuda da informação espectral, os instrumentos hifenizados apresentam maior desempenho em termos da eliminação de interferências instrumentais, correção do tempo de retenção, seletividade, capacidade de separação cromatográfica e precisão (GIRI et al., 2010). Acredita-se que o perfil químico obtido por cromatografia hifenizada, se tornará a principal ferramenta para o controle de qualidade de drogas vegetais e formulações obtidas destas (GIRI et al., 2010).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 70% (V/V) DA SEMENTE DE *P. americana* POR CLUE-ESI-QTOF-EM.

Devido a possível presença de compostos com poucos cromóforos em suas estruturas e baixa absorção destes em UV (SWARTZ, 2010), a análise dos extratos provenientes do planejamento fatorial foi realizada por CLUE acoplado à espectrômetro de massas-ESI-QToF, ES⁺ e ES⁻, por ser uma técnica mais sensível, rápida e apresentar maior quantidade de informações de uma amostra. A combinação de técnicas de separação, como a cromatografia, com espectrometria de massas expande a capacidade seletiva de análise, pois a identificação dos compostos é baseada em sua razão massa/carga (m/z), bem como perfil de fragmentação e padrão isotópico. Sugere-se que é possível obter uma precisão de classificação de cerca de 95% na identificação de plantas medicinais usando os dados de extratos de plantas analisados por CL-EM (KHARYUK et al., 2018).

Sendo assim, após a análise por CLAE-DAD procedeu-se a análise dos extratos por CLUE-ESI-QToF-EM. Primeiramente foi analisado a mesma amostra utilizada na análise por CLAE-DAD, porém diluída à concentração de 0,5 mg/mL. À fim de aumentar a intensidade dos sinais cromatográficos, foi em seguida analisada a concentração de 1,0 mg/mL, resultando no perfil cromatográfico apresentado nas FIGURA 13 e FIGURA 14.

A análise feita por CLUE-ESI-QToF-EM no modo MS^e, tanto no positivo quanto negativo (ES⁺ e ES⁻) possibilitou a identificação de diversas substâncias (TABELAS 3 e 4) a partir de comparação com perfil de fragmentação (p. ex. FIGURA 17), substância padrão comercial, base de dados (PubChem) e dados descritos na

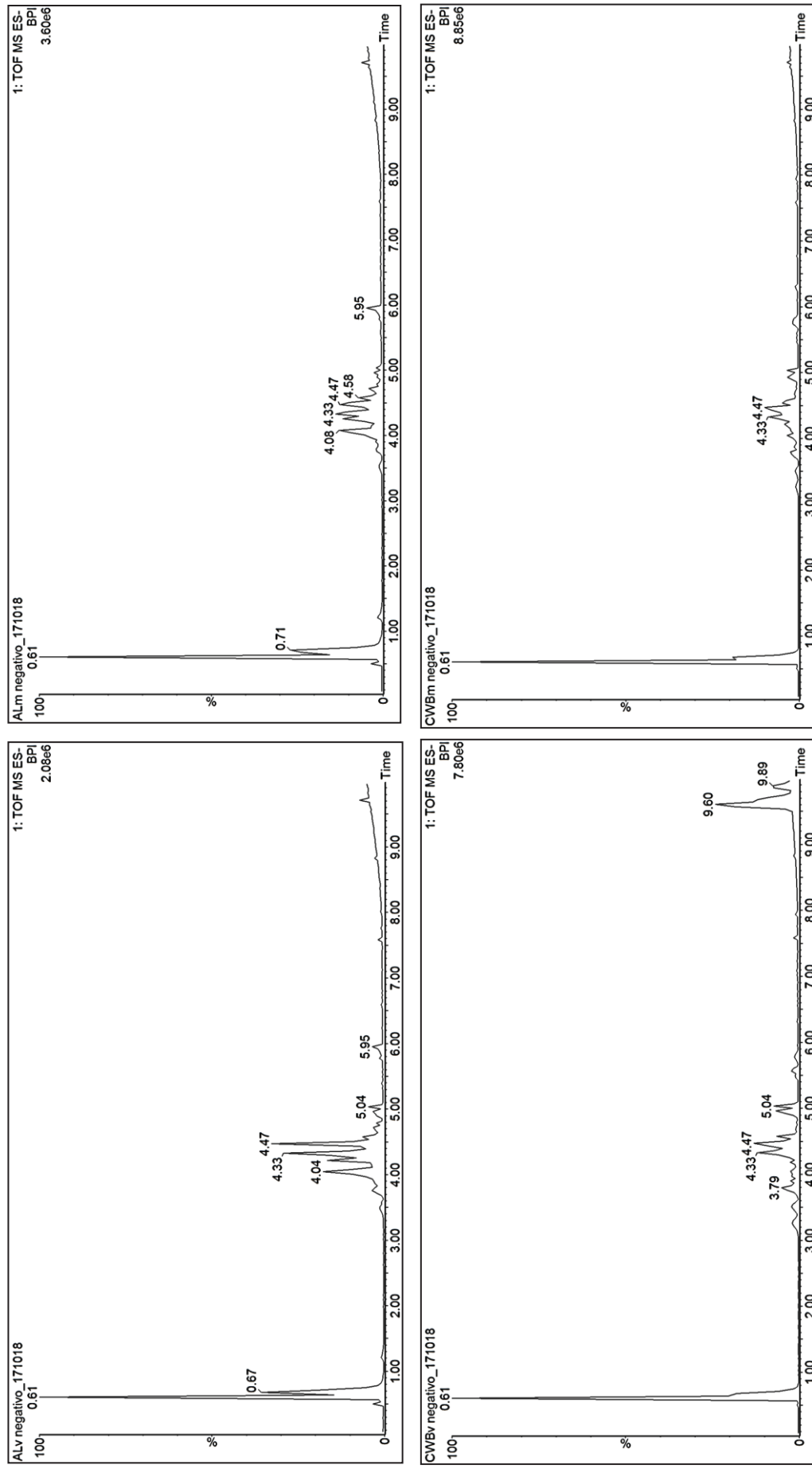
literatura, como os estudos de FIGUEROA et al. (2018), LIU et al. (2018), MARCH; MIAO (2004), CLIFFORD et al. (2003), SANDHU; GU (2010), LV et al. (2015), SCOPARO et al. (2012) LIN et al. (2014), entre outros.

FIGURA 13 – PERFIL CROMATOGRAFICO OBTIDO POR CLUE-ESI-QToF-EM DAS AMOSTRAS AL.V.2, AL.M.2, CWB.V.2 E CWB.M.2 (1,0 mg/mL), ES⁺



FONTE: A autora (2019).

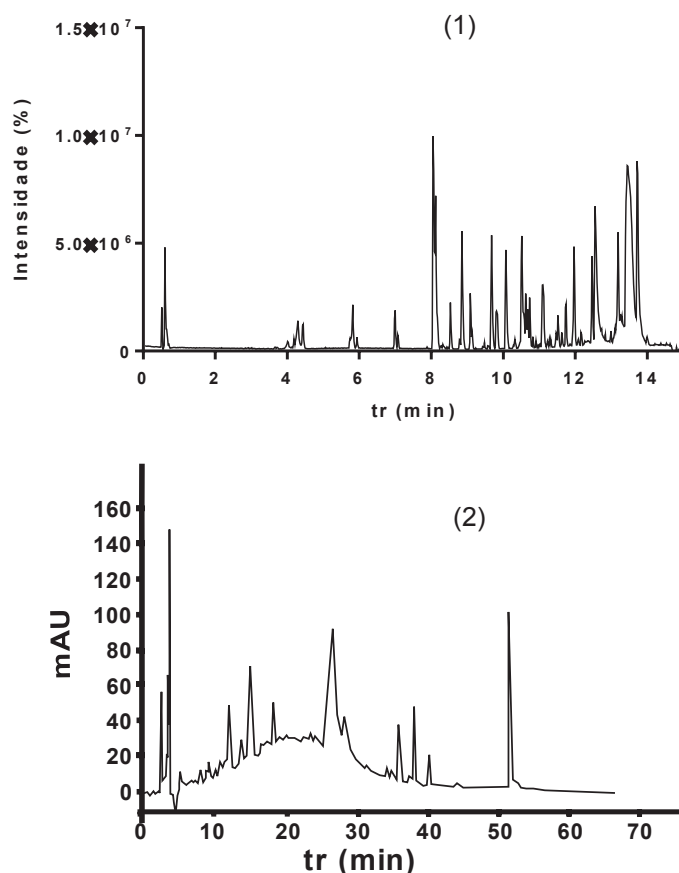
FIGURA 14 – PERFIL CROMATOGRAFICO OBTIDO POR CLUE-ESI-QToF-EM DAS AMOSTRAS AL.V.2, AL.M.2, CWB.V.2 E CWB.M.2 (1,0 mg/mL), ES-



FONTE: A autora (2019).

Observando os cromatogramas obtidos pelas técnicas CLAE-DAD e CLUE-ESI-QToF-EM (FIGURA 15) observa-se um aumento na quantidade de sinais obtidos, de 13 para 30, confirmando a maior sensibilidade do segundo método para identificação dos metabólitos presentes no extrato analisado.

FIGURA 15 - PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES⁺ (1) E CLAE-DAD (2), DA AMOSTRA AL.V



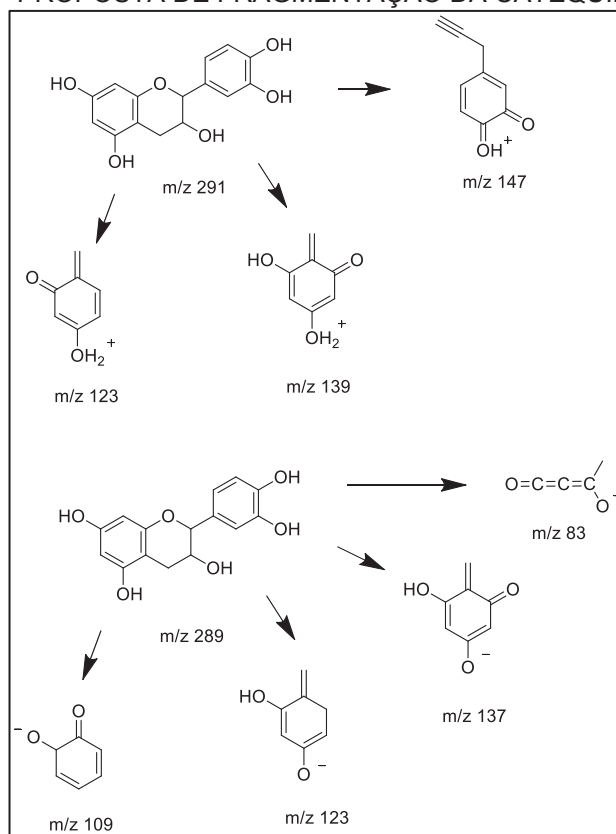
FONTE: A autora (2019).

As TABELAS 3 e 4 apresentam os dados cromatográficos e as substâncias identificadas nos extratos hidroalcoólicos de sementes de *P. americana*. Foram identificadas 46 substâncias pertencentes a diversas classes, como: acetogeninas (persedieno, persenonas A, B e C, acetato de acovadeno, acetato de avocadino, persina), carboidratos (perseitol), compostos fenólicos com função ácida (ácido cafeoilquínico, coumaroilquínico, cafeico, quínico, hidróxiabscícico), taninos condensados (procianidinas dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros), polifenóis (catequina, procianidinas, cinchonaína), ácidos orgânicos (ácido cítrico, quínico,

málico), álcoois graxos (avocadinona), feniletanoides (tirosol-glicosídeo e hidróxitirosol-glicosídeo) e iridoide (penstemida).

A catequina, *epi*-catequina e procianidina dímero do tipo B foram identificadas e confirmadas após comparação com os dados obtidos de CLUE-EM de substâncias padrão comerciais, como padrão de fragmentação e tempo de retenção. A estrutura da catequina possibilita ionização tanto no modo positivo quanto negativo, levando ao perfil de fragmentação proposto na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Os ácidos clorogênicos e seus isômeros foram distinguidos e identificados por padrões de fragmentação que corroboram com identificações previamente descritas por CLIFFORD et al. (2003) e FANG; YU; PRIOR (2002).

FIGURA 16 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DA CATEQUINA ES⁺ E ES⁻



FONTE: Adaptado de PubChem Database (2019).

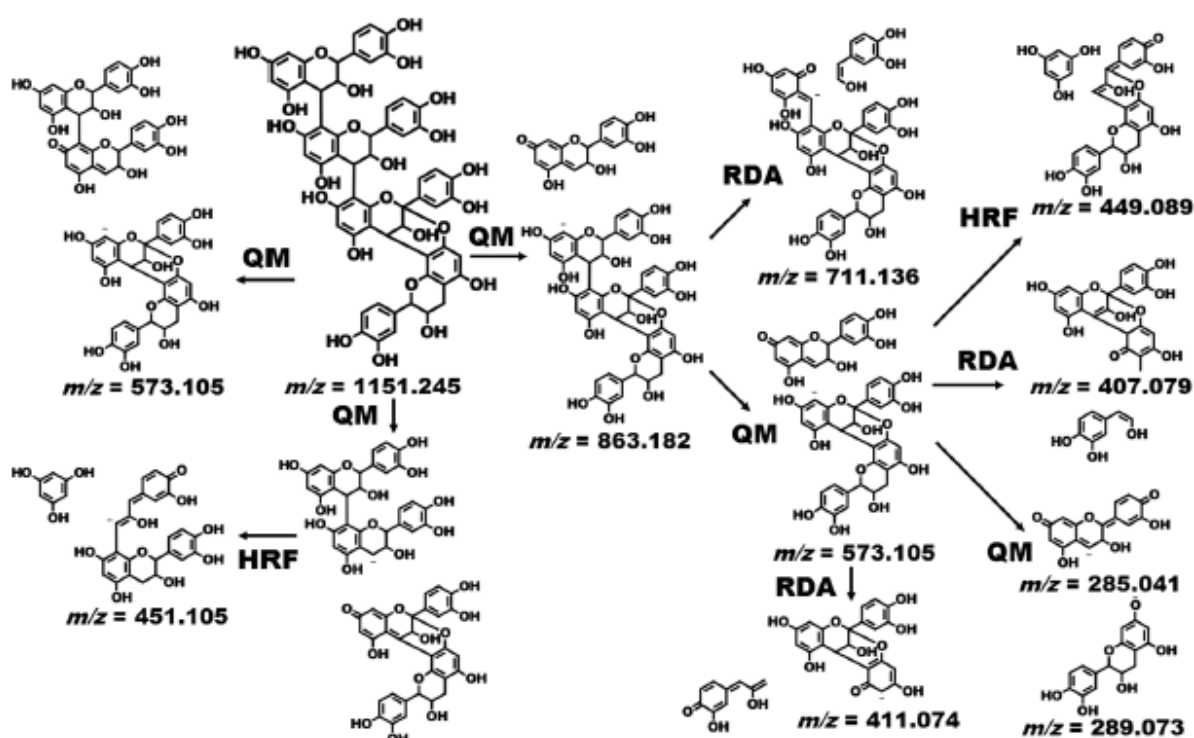
Os isômeros de **ácido cafeoilquínico** apresentaram o íon molecular [M-H]⁻ m/z 353 correspondente a fórmula molecular C₁₆H₁₈O₉ e os isômeros de **ácido coumaroilquínico** apresentaram o íon molecular m/z 337 correspondente a fórmula molecular C₁₆H₁₈O₈, sendo que o **ácido 3-cafeoilquínico** apresentou íon molecular m/z 353, pico base MS² m/z 191 e íon secundário em m/z 179, e fragmento m/z 191

[ácido quínico - H]⁻. O **ácido 5-cafeoilquínico** foi identificado pelo íon molecular m/z 353, pico base MS² [ácido quínico - H]⁻ m/z 191 e íon secundário de m/z 179. Já o **ácido 4-cafeoilquínico** foi identificado por apresentar íon molecular m/z 353, pico base MS² m/z 173 referente a [ácido quínico-H₂O-H]⁻ e fragmento em [ácido quínico-H]⁻ m/z 191. Em relação aos ácidos coumaroilquínicos, o **ácido 3-p-coumaroilquínico** foi identificado por apresentar íon molecular m/z 337, pico base MS² m/z 163 referente a [cinamoil - H]⁻, fragmento em [ácido quínico - H]⁻ m/z 191 e [ácido quínico - H₂O - H]⁻ m/z 173. O **ácido 5-p-coumaroilquínico** apresentou íon molecular m/z 337, pico base MS² m/z 191 referente a [ácido quínico - H]⁻, e fragmentos [ácido quínico-H₂O-H]⁻ m/z 173 e [cinamoil - H]⁻ m/z 163. E o **ácido 4-p-coumaroilquínico**, foi identificado pelo íon molecular m/z 337, pico base MS² m/z 173 referente a [ácido quínico - H₂O - H]⁻ e fragmentos em [ácido quínico - H]⁻ m/z 191 e [cinamoil - H]⁻ m/z 163. O **ácido 4-feruloilquínico** foi identificado pelo íon molecular m/z 367, pico base MS² m/z 173 referente a [ácido quínico - H₂O - H]⁻ e fragmento [ácido quínico - H]⁻ m/z 191.

As procianidinas foram identificadas por seus fragmentos frequentemente gerados através de Retro-Diels-Alder (RDA), clivagem por mecanismo quinona metídeo (QM) e fissão do anel heterocíclico (HRF) como sugerido por FIGUEROA et al. (2018) e FIGURA 17. A identificação das procianidinas foi embasada em seus íons moleculares e perfil de fragmentação, de forma que a **procianidina dímero A** apresentou pico do íon molecular em m/z 575 [M-H]⁻ correspondente a fórmula molecular C₃₀H₂₄O₁₂ e fragmentos em m/z 125, 289 [catequina]⁻, 407 [M-152-18-H]⁻ e 285; a **procianidina pentâmero A** apresentou pico do íon molecular em m/z 1439 [M-H]⁻ correspondente a fórmula C₇₅H₆₀O₃₀ e fragmentos em m/z 125, 289 [catequina]⁻, 411 e 407 [M-152-18-H]⁻; a **procianidina pentâmero B** apresentou pico do íon molecular em m/z 1440 [M-H]⁻ correspondente a fórmula molecular C₇₅H₆₂O₃₀ e fragmentos em m/z 125, 289 [catequina]⁻, 407 [M-152-18-H]⁻ e 411; a **procianidina tetrâmero B** apresentou pico base em m/z 1153 [M-H]⁻ correspondente a fórmula molecular C₆₀H₅₀O₂₄ e fragmentos em m/z 125, 289 [catequina]⁻, 407 [M-152-18-H]⁻ e 411; a **procianidina dímero B** apresentou pico do íon molecular em m/z 577 [M-H]⁻ correspondente a fórmula molecular C₃₀H₂₆O₁₂ e fragmentos em m/z 289 [catequina]⁻, 125 e 407 [M-152-18-H]⁻; a **procianidina trímero B** apresentou pico do íon molecular em m/z 865 [M-H]⁻ correspondente a fórmula molecular C₄₅H₃₈O₁₈ e fragmentos em m/z 289 [catequina]⁻, 287, 407 [M-152-18-H]⁻, 577 (procianidina dímero), 451, 695 e

739; a **procianidina tetrâmero A** apresentou pico do íon molecular em m/z 1151 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula $C_{60}H_{48}O_{24}$ e fragmentos em m/z 863 $[M\text{-catequina}]^-$, 289 $[catequina]^-$, 411, 711 e 451; **procianidina trímico A**: com pico do íon molecular em m/z 863 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{45}H_{36}O_{18}$ e fragmentos em m/z 289 $[catequina]^-$, 411, 573 e 711. Os íons encontrados corroboram com os resultados de RUSH et al. (2018), NEMES et al. (2018) e FIGUEROA et al. (2018).

FIGURA 17 – PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO E ESPECTRO MS/MS DA PROCIANIDINA TIPO A DÍMERO, TRÍMICO E TETRÂMICO



FONTE: FIGUEROA et al. (2018).

Dentre os compostos identificados no modo íon negativo estão: **perseitol**: com pico do íon molecular em m/z 211 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_7H_{16}O_7$, e fragmento em m/z 101, que foi previamente identificado em sementes de *P. americana* quando extraído em etOH 80% (v/v) (LIU et al., 1999), hexano seguido de MeOH:H₂O (LÓPEZ-COBO et al., 2016) e por etOH 50% (v/v) utilizando-se extrator acelerado por solvente (FIGUEROA et al., 2018). O **ácido quínico** foi identificado com pico do íon molecular em m/z 191 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_7H_{12}O_6$ e fragmentos em m/z 85, 93, 127, 109, 171, 173, 81 e 71; **ácido isocítrico**: com pico do íon molecular em m/z 191 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_6H_8O_7$ e

fragmento em m/z 111 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$; **ácido cítrico**: com pico do íon molecular em m/z 191 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_6H_8O_7$ e fragmentos em m/z 111 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$, 87, 85 $[M-H-H_2O-2CO_2]^-$, 109 e 129 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$; **ácido succínico**: com pico do íon molecular em m/z 117 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_4H_6O_4$; **ácido málico**: com pico do íon molecular em m/z 133 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_4H_6O_5$; **hidróxitirosol-glicosídeo**: com pico do íon molecular em m/z 315 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_8$ e fragmentos em m/z 135, 123 e 71; **tirosol-glicosídeo**: com pico do íon molecular em m/z 299 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_7$; **penstemida**: com pico do íon molecular em m/z 443 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{32}O_{10}$ e fragmentos em m/z 101 e 113; **ácido diidrocafeico**: com pico do íon molecular em m/z 181 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_9H_{10}O_4$; **catequina/epi-catequina**: com pico do íon molecular em m/z 289 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ e fragmentos em m/z 123, 109, 159, 137, 97, 187 e 83; **ácido hidróxiabscísico glicosídeo**: com pico do íon molecular em m/z 441 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_{10}$ e fragmentos em m/z 139, 330, 161 e 397 e **cinchonaina**: com pico do íon molecular em m/z 451 $[M-H]^-$ correspondente a fórmula molecular $C_{24}O_{20}O_9$. Os ácidos, **cítrico** e **quínico**, foram diferenciados pela presença do íon m/z 111 fragmento presente apenas no ácido cítrico.

Grande parte dos estudos realizados utilizando a técnica de CLUE-ESI-QToF-EM analisam apenas no modo negativo devido ao fato de as sementes apresentarem grande quantidade de compostos fenólicos, porém o presente trabalho investigou substâncias tanto no modo negativo quanto positivo. O ácido quínico m/z 191 $[M-H]^-$, ácido cítrico m/z 191 $[M-H]^-$, penstemida m/z 443 $[M-H]^-$, ácido cumaroilquínico m/z 337 $[M-H]^-$ e ácido cafeoilquínico m/z 353 $[M-H]^-$, já foram descritos para esta espécie em sementes quando extraídos por hexano seguido de MeOH:H₂O (LÓPEZ-COBO et al., 2016) e por EtOH 50% (v/v) (FIGUEROA et al., 2018). O ácido málico m/z 133 $[M-H]^-$, a cinchonaina m/z 451 $[M-H]^-$, o ácido feruloilquínico m/z 367 $[M-H]^-$, o ácido succínico m/z 117 $[M-H]^-$, ácido hidróxiabscísico glicosídeo m/z 441 $[M-H]^-$, o hidróxitirosol glicosídeo m/z 315 $[M-H]^-$ e ácido diidrocafeico m/z 181 $[M-H]^-$ foram descritos para *P. americana* em sementes quando extraídos por EtOH 50% (v/v) (FIGUEROA et al., 2018).

Os compostos foram identificados por seu perfil de fragmentação também no modo íon positivo, sendo a **procianidina tipo B, dímero** com pico do íon molecular

em m/z 867 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{12}$ e fragmentos em m/z 127, 139, 287, 409, 291, sendo que as procianidinas do tipo B foram previamente identificadas na semente também por FIGUEROA et al. (2018) quando extraídas em etOH 50% (v/v, e quando extraídas por acetona:H₂O:ácido acético (WANG; BOSTIC; GU, 2010). A **procianidina tipo C** foi identificada por seu pico do íon molecular em m/z 867 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{45}H_{38}O_{18}$ e fragmentos em m/z 287, 533, 289 (catequina), 409, 579, 291; a **catequina/epi-catequina** com pico do íon molecular em m/z 291 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ e fragmentos em m/z 139, 123, 147, 161, e foi previamente identificada na semente quando extraída por etOH 50% (v/v) utilizando-se extrator acelerado por solvente (FIGUEROA et al., 2018) e também quando extraída por acetona:água (RODRIGUEZ-CARPENA et al., 2011). A **avocadinona** foi identificada por seu pico do íon molecular em m/z 283 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{17}H_{30}O_3$ e fragmentos em m/z 305 $[M+Na]^+$, 265 $[M+H-H_2O]^+$, 247 $[M+H-2H_2O]^+$; o **acetato de avocadinona** com pico do íon molecular em m/z 325 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{19}H_{32}O_4$ e fragmentos em m/z 347 $[M+Na]^+$, 265 $[M+H-HOAc]^+$, 247 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$; o **avocadino**: com pico do íon molecular em m/z 285 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{17}H_{32}O_3$ e fragmentos em m/z 267 $[M+H-H_2O]^+$, 307 $[M+Na]^+$, 249 $[M+H-2H_2O]^+$, 231 $[M+H-3H_2O]^+$; o **acetato de avocadino**: com pico do íon molecular em m/z 327 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{19}H_{34}O_4$ e fragmentos em m/z 349 $[M+Na]^+$, 249 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$, 267 $[M+H-HOAc]^+$, 231 $[M+H-HOAc-2H_2O]^+$, 309 $[M+H-H_2O]^+$; **avocadeno**: com pico do íon molecular em m/z 287 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_3$ e fragmentos em m/z 269 $[M+H-H_2O]^+$, 233 $[M+H-2H_2O]^+$, 251 $[M+H-2H_2O]^+$, 309 $[M+Na]^+$. As substâncias avocadeno $[M+H]^+$ m/z 287, avocadino $[M+H]^+$ m/z 285 e acetato de avocadino $[M+H]^+$ m/z 327 foram previamente identificadas em sementes quando extraídos por acetona ou acetonitrila:álcool metílico (KASHMAN; NEEMAN; LIFSHITZ, 1969a; AHMED et al., 2018). O **acetato de avocadeno** foi identificado por seu pico do íon molecular em m/z 329 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{19}H_{36}O_4$ e fragmentos em m/z 351 $[M+Na]^+$, 269 $[M+H-HOAc]^+$, 233 $[M+H-HOAc-2H_2O]^+$, 251 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$, 311 $[M+H-H_2O]^+$, e foi previamente identificado em sementes quando extraídas em acetona (SANCHEZ et al., 2013) e em hexano (KASHMAN; NEEMAN; LIFSHITZ, 1969b). A **1-hidróxi-heneicosa-2,12,15-trien-4-ona** foi identificada pelo pico do íon molecular em m/z 321 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{36}O_2$ e

fragmento em m/z 303 $[M+H-H_2O]^+$ e foi previamente identificada no fruto quando extraído por hexano (KAWAGISHI et al., 2001). A **persenona B**: com pico do íon molecular em m/z 355 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{38}O_4$ e fragmentos em m/z 377 $[M+Na]^+$, 337 $[M+H-H_2O]^+$, 295 $[M+H-HOAc]^+$; o **persedieno ou persenona C**: com pico do íon molecular em m/z 353 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ e fragmentos em m/z 293 $[M+H-HOAc]^+$, 275 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$; o **1,2,4-trihidróxinonadecano** com pico do íon molecular em m/z 339 $[M+Na]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{19}H_{40}O_3$ e fragmentos em m/z 281 $[M+H-2H_2O]^+$, 263 $[M+H-3H_2O]^+$, 299 $[M+H-H_2O]^+$, que foi previamente identificado no fruto quando extraído por EtOH 75% (v/v) (OBERLIES et al., 1998). A **persenona A** foi identificada por seu pico do íon molecular em m/z 379 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{36}O_4$ e fragmentos em m/z 401 $[M+Na]^+$, 301 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$; **persina**: com pico do íon molecular em m/z 381 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{23}H_{40}O_4$ e fragmento em m/z 303 $[M+H-HOAc-H_2O]^+$, 263. A persina $[M+H]^+$ m/z 381, persenona B $[M+H]^+$ m/z 355, persenona A $[M+H]^+$ m/z 379, persenona C $[M+H]^+$ m/z 353 e persedieno, foram previamente identificados na semente quando extraídos em acetona por SANCHEZ et al. (2013) e RODRÍGUEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-BRENES; DÍAZ DE LA GARZA (2015).

Através da caracterização química do extrato hidroalcoólico 70% (v/v) observou-se diferenças qualitativas e quantitativas entre as 4 amostras analisadas, como por exemplo o ácido cítrico e o ácido isocítrico que foram encontrados apenas nas amostras AL.v e AL.m, e o ácido diidrocafeico que foi encontrado apenas na amostra CWB.v.

TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES-

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa Calculada	[M-H] ⁻ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					211,082	-3,32	101,0288(100)	
AL.M					211,0817	-1,90	101,0293(100)	
CWB.V	0,64	C ₇ H ₁₆ O ₇	212,0891	211,0813	211,0819	-2,84	101,0288(100)	perseitol
CWB.M					211,0819	-2,84	101,0286(100)	
AL.V					191,0554	-1,05	173,0547 (10), 171,0385 (10), 127,0463 (40), 109,0342 (25), 93,0389 (40), 85,0335 (100), 81,0382 (10), 71,0169 (5)	
AL.M					191,0554	-1,05	173,0546 (10), 171,0380 (10), 127,0463 (25), 93,0386 (40), 109,0348 (20), 85,0336 (100), 81,0386 (8), 71,0169 (4)	
CWB.V	0,66	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0634	191,0552	191,0555	-1,57	173,0541 (10), 171,0378 (10), 127,0459 (25), 109,0346 (20), 93,0389 (45), 85,0335 (100), 81,0393 (8), 71,0178 (5)	ácido quínico
CWB.M					191,0554	-1,05	173,0530 (10), 171,0384 (10), 127,0461 (30), 109,0347 (25), 93,0392 (40), 85,0334 (100), 81,0378 (10), 71,0180 (5)	
AL.V					191,0192	-1,57	111,0113(100)	
AL.M					191,0188	0,52	111,0111(100)	
CWB.V	0,67	C ₆ H ₈ O ₇	192,0267	191,0189	nd	nd	nd	ácido isocítrico
CWB.M					nd	nd	nd	
AL.V					191,0191	-1,05	129,0268 (5), 111,0139 (100), 87,0128 (80), 85,0334 (40)	
AL.M					191,0191	-1,05	129,0253 (3), 111,0140 (100), 109,0348 (15), 87,0128 (80), 85,0333(35)	
CWB.V	0,70	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270	191,0189	nd	nd	nd	ácido cítrico
CWB.M					nd	nd	nd	
AL.V					117,0189	-2,56	nd	
AL.M					117,0181	4,27	nd	
CWB.V	0,78	C ₄ H ₆ O ₄	118,0264	117,0186	117,0182	3,42	nd	ácido succínico
CWB.M					117,0187	-0,85	nd	
AL.V					133,0142	-5,26	nd	
AL.M					133,0135	0,00	nd	
CWB.V	0,78	C ₄ H ₆ O ₅	134,0213	133,0135	133,0134	0,75	nd	ácido málico
CWB.M					133,014	-3,76	nd	
AL.V					353,0865	2,27	191,0651 (100), 179,0436 (50), 135,0514 (70)	
AL.M					353,0862	3,12	191,0652 (100), 179,0437 (50), 135,0514 (70)	
CWB.V	3,50	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0950	353,0873	353,0865	2,27	191,0650 (100), 179,0430 (50), 135,0511 (80)	ácido 3- cafeoilquínico
CWB.M					353,0867	1,70	191,0643 (100), 179,0430 (50), 135,0507(70)	

TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES-

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa Calculada	[M-H] ⁻ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					315,1075	-0,32	nd	
AL.M					315,1074	0,00	nd	
CWB.V	3,50	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	316,1152	315,1074	315,1074	0,00	135,0481 (100), 123,0467 (55), 71,0153 (25)	hidróxitirosol glicosídeo
CWB.M					315,1075	-0,32	nd	
AL.V					299,1125	0,00	nd	
AL.M					299,1130	-1,67	nd	
CWB.V	3,51	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	300,1203	299,1125	299,1126	-0,33	nd	
CWB.M					299,1123	0,67	nd	
AL.V					443,1911	-0,68	113,0286 (40), 101,0285 (100)	
AL.M					443,1913	-1,13	113,0287 (40), 101,0282 (100)	
CWB.V	3,90	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	444,1986	443,1908	443,1913	-1,13	113,0283 (50), 101,0278 (100)	penstemida
CWB.M					443,1910	-0,45	113,0274 (40), 101,0272 (100)	
AL.V					353,0864	2,55	191,0543 (100), 179,0349 (63), 135,0435 (75)	
AL.M					353,0869	1,13	191,0543 (100), 179,0350 (65), 135,0435 (75)	
CWB.V	3,90	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0950	353,0873	353,0872	0,28	191,0552 (100), 179,0349 (60), 135,0442 (70)	ácido 5- cateoilquínico
CWB.M					353,0865	2,27	191,055 (100), 179,0351 (60), 135,0439 (75)	
AL.V					337,0917	1,78	191,0629 (90), 173,0554 (15), 163,0494 (100)	
AL.M					337,0922	0,30	191,0641 (85), 173,0553 (15), 163,0472 (100)	
CWB.V	3,97	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,1001	337,0923	337,0917	1,78	191,0630 (50), 173,0525 (10), 163,0478 (100)	ácido 3- <i>p</i> - coumaroilquínico
CWB.M					337,0915	2,37	191,0650 (70), 173,0534 (10), 163,0464 (100)	
AL.V					289,0704	2,77	187,0484 (15), 159,0521 (30), 137,0309 (25), 123,0502 (100), 109,0340 (80), 97,0335 (20), 83,0169 (10)	
AL.M					289,0714	-0,69	187,0489 (10), 159,0521 (35), 137,0303 (30), 123,0503 (100), 109,0340 (80), 97,0336 (35), 83,0165 (10)	
CWB.V	4,00	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,0790	289,0712	289,071	0,69	187,0473 (15), 159,0515 (35), 137,0305 (30), 123,0501 (100), 109,0339 (80), 97,0329 (25), 83,0170 (10)	***catequina
CWB.M					289,0708	1,38	187,0476 (10), 159,0518 (30), 137,0298 (20), 123,0500 (100), 109,0334 (80), 97,0332 (20), 83,0176 (10)	
AL.V					353,0856	4,81	191,0651 (80), 173,0541 (100)	
AL.M					353,0869	1,13	191,0644 (80), 173,0537 (100)	ácido 4- cateoilquínico
CWB.V	4,10	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0950	353,0873	353,0869	1,13	191,0646 (70), 173,0527 (100)	
CWB.M					353,0864	2,55	191,0646 (95), 173,0532 (100)	

TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES-

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa Calculada	[M-H] ⁻ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					443,1908	0,00	113,0294 (55), 101,0277 (100)	penstemida isômero
AL.M					443,1913	-1,13	113,0278 (45), 101,0284 (100)	
CWB.V	4,10	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	444,1986	443,1908	443,1908	0,00	113,0278 (50), 101,0276 (100)	
CWB.M					443,1906	0,45	113,0285 (30), 101,0278 (100)	
AL.V					575,1179	1,91	407,0895 (60), 289,0799 (85), 285,0483 (25), 125,0273 (100)	procianidina dímero A
AL.M					575,1181	1,56	407,0894 (50), 289,0803 (90), 285,0493 (20), 125,0272 (100)	
CWB.V	4,10	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	576,1268	575,119	575,1176	2,43	407,0903 (60), 289,0802 (90), 285,0495 (20), 125,0273 (100)	
CWB.M					575,1177	2,26	407,0901 (70), 289,0800 (100), 285,0493 (20), 125,0272 (95)	
AL.V					337,0918	1,48	191,0650 (100), 173,0597 (10), 163,0479 (80)	ácido 5- <i>p</i> - coumaroilquínico
AL.M					337,0918	1,48	191,0665 (100), 173,0553 (5), 163,0471 (80)	
CWB.V	4,18	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,1001	337,0923	337,0922	0,30	191,0633 (100), 163,0502 (50)	
CWB.M					337,0918	1,48	191,0664 (100), 163,0486 (70)	
AL.V					719,1489	1,11	411,0916 (20), 407,0961 (15), 289,0853 (40), 125,0303 (100)	procianidina pentâmero A
AL.M					719,1494	0,42	411,0910 (20), 407,0963 (15), 289,0855 (35), 125,0301 (100)	
CWB.V	4,40	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₀	1440,3169	719,1497	719,1494	0,42	411,0917 (10), 407,0956 (20), 289,0850 (30), 125,0299 (100)	
CWB.M					719,1494	0,42	411,0929 (10), 407,0958 (15), 289,0854 (30), 125,0299 (100)	
AL.V					720,1573	1,67	411,0880 (15), 407,0934 (15), 289,0826 (30), 125,0290 (100)	procianidina pentâmero B
AL.M					720,155	4,86	411,0871 (15), 407,0935 (20), 289,0826 (35), 125,0287 (100)	
CWB.V	4,40	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	1441,3243	720,1585	720,1566	2,64	411,0883 (10), 407,0920 (15), 289,0820 (30), 125,0286 (100)	
CWB.M					720,1564	2,92	411,0858 (10), 407,0900 (20), 289,0814 (30), 125,0282 (100)	
AL.V					nd		nd	ácido diidrocafeico
AL.M					nd		nd	
CWB.V	4,43	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579	181,0501	181,0495	3,31	nd	
CWB.M					nd		nd	
AL.V					1153,255	5,55	865,2206 (100), 577,1521 (50), 575,1365 (60), 413,0974 (40), 287,0649 (60)	procianidina tetramero B
AL.M					1153,2559	4,77	865,2145 (100), 577,1540 (60), 575,1359 (70), 413,0943 (35), 287,0680 (70)	
CWB.V	4,50	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1.154,2692	1.153,2614	1153,2589	2,17	865,2158 (60), 577,1533 (70), 575,1411 (80), 287,0652 (100)	
CWB.M					1153,2599	1,30	865,2156 (50), 577,1522 (70), 575,1370 (78), 287,0653 (100)	

TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES-

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa Calculada	[M-H] ⁻ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					577,134	1,04	407,0576 (50), 289,0705 (100), 125,0235 (88)	***procianidina dímero B
AL.M	4,50	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1346	577,1332	2,43	407,0759 (55), 289,0709 (100), 125,0235 (92)	
CWB.V					577,134	1,04	407,0763 (62), 289,0707 (100), 125,0235 (85)	
CWB.M					577,1335	1,91	407,0757 (60), 289,0706 (100), 125,0237 (95)	
AL.V					289,0709	1,04	137,0303 (20), 123,0504 (100), 109,0341 (90), 93,0387 (10), 81,0371(10)	***epi-catequina
AL.M	4,54	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,079	289,0712	289,0706	2,08	137,0306 (15), 123,0498 (100), 109,0339 (40), 93,0394 (20), 81,0384(15)	
CWB.V					289,071	0,69	137,0298 (30), 123,0506 (100), 109,0360 (80), 93,0384 (15), 81,0379 (5)	
CWB.M					289,071	0,69	137,0304 (30), 123,0501 (100), 109,0339 (80), 93,0377 (15), 81,0377(10)	
AL.V					367,1028	0,27	191,0536 (60), 173,0472 (100)	ácido 4- feruloilquínico
AL.M	4,58				367,1029	0,00	191,0512 (80), 173,0500 (100)	
CWB.V	4,54	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368,1107	367,1029	367,1017	3,27	191,0535 (75), 173,0444 (100)	
CWB.M					367,1009	5,45	191,0526 (70), 173,0469 (100)	
AL.V					337,0918	1,48	191,00650 (40), 173,0536 (100), 163,0484 (25)	ácido 4- <i>p</i> - coumaroilquínico
AL.M	4,60	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338,1001	337,0923	337,0914	2,67	191,0698 (15), 173,0544 (100), 163,0494 (25)	
CWB.V					337,0914	2,67	191,0650 (10), 173,0543 (100), 163,0474 (25)	
CWB.M					337,0916	2,08	191,0637 (20), 173,0526 (100), 163,0473 (30)	
AL.V					865,1931	5,66	739,1667 (10), 695,1373 (12), 577,1342 (35), 451,1005 (20), 407,0757 (50), 289,0704 (100), 287,0555 (60)	procianidina trímero B
AL.M					865,195	3,47	739,1639 (7), 695,1336 (12), 577,1346 (30), 451,1005 (20), 407,0760 (60), 289,0706 (100), 287,0550 (55)	
CWB.V	4,93	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,2058	865,198	865,1959	2,43	739,1628 (10), 695,1373 (12), 577,1332 (35), 451,1016 (20), 407,0759(50), 289,0707 (100), 287,0552 (65)	
CWB.M					865,1939	4,74	739,1620 (10), 695,1356 (10), 577,1323 (35), 451,1010 (20), 407,0754 (52), 289,0705 (100), 287,0550(70)	
AL.V					441,1749	0,68	330,1503 (10), 139,0807 (100)	ácido hidróxiabscísico glicosídeo
AL.M	5,00	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	442,183	441,1752	441,1754	-0,45	330,1454 (20), 139,0825 (100)	
CWB.V					441,1759	-1,59	139,0819 (100), 161,0568 (10), 397,2098 (5), 330,1465 (20), 139,0816 (100), 330,1477 (15), 397,1990 (5)	
CWB.M					441,1758	-1,36		

TABELA 3 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES-

(conclusão)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa Calculada	[M-H] ⁻ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	m/z (%)	Fragmentos	Substância sugerida
AL.V					1151,2452	0,43	863,01819 (100), 711,1343 (45), 451,1021 (40), 411,0708 (60), 289,0706 (80)		
AL.M					1151,2456	0,09	863,1809 (95), 711,1328 (45), 451,1017 (40), 411,0707 (75), 289,0706(100)		
CWB.V	5,00	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	1152,2536	1151,2457	1151,2465	-0,69	863,01823 (100), 711,1346 (50), 451,1024 (45), 411,0712 (70), 289,0710 (95).		procianidina tetramero A
CWB.M					1151,2451	0,52	863,1819 (70), 711,1341 (35), 451,1021 (40), 411,0710 (50), 289,0709(100)		
AL.V					863,1834	-1,27	711,1343 (5), 573,1028 (7), 411,0712 (90), 289,0710 (100).		
AL.M					863,1821	0,23	711,1338 (60), 573,1019 (50), 411,0709 (98), 289,0708 (100).		
CWB.V	5,04	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	864,1902	863,1823	863,183	-0,81	711,1343 (75), 573,1030 (45), 411,0714 (100), 289,0711 (98).		procianidina trímero A
CWB.M					863,1823	0,00	711,1334 (55), 573,1021 (40), 411,0710 (90), 289,0711 (100).		
AL.V					451,1021	1,77	nd		
AL.M					451,1027	0,44	nd		
CWB.V	5,71	C ₂₄ O ₂₀ O ₉	452,1107	451,1029	451,1017	2,66	nd		cinchonaina
CWB.M					451,1013	3,55	nd		

FONTE: A autora (2019).

NOTAS: nd = não detectado; ***Confirmado com padrão.

TABELA 4 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QTOF-EM, ES⁺

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa calculada	[M+H] ⁺ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					291,0869	-0,34	161,0623 (20), 147,0468 (30), 139,0414 (100), 123,0467 (70)	***catequina
AL.M	4,00	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,0790	291,0868	291,0865	1,03	161,0628 (20), 147,0469 (30), 139,0416 (100), 123,0466 (70)	
CWB.V					291,0865	1,03	161,0600 (20), 147,0448 (30), 139,0403 (100), 123,0447(95)	
CWB.M					291,0867	0,34	161,0609 (20), 147,0451 (30), 139,0399 (100), 123,0450 (95)	
AL.V					579,1503	-0,17	409,0938 (50), 291,0872 (20), 287,0563 (70), 139,0400 (70), 127,0403 (100)	***procianidina tipo A, dímero
AL.M					579,1496	1,04	409,0937 (50), 291,0872 (20), 287,0555 (70), 139,0397 (70), 127,0400 (100)	
CWB.V	4,20	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	579,1502	579,1496	1,04	409,0927 (40), 291,0873 (25), 287,0548 (60), 139,0399 (60), 127,0401 (100)	
CWB.M					579,1499	0,52	409,0918 (40), 291,0869 (20), 287,0556 (60), 139,0396 (60), 127,0397 (100)	
AL.V					867,2114	2,54	579,1487 (30), 533,1086 (60), 409,0919 (40), 291,0859 (20), 289,0703 (40), 287,0552 (100)	procianidina tipo C
AL.M					867,2119	1,96	579,1537 (20), 533,1115 (50), 409,0946 (30), 291,0877 (15), 289,0708 (40), 287,0573 (100)	
CWB.V	4,20	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,2058	867,2136	867,2112	2,77	287,0577 (100), 533,1127 (50), 409,0952 (40), 289,0713 (35), 291,0878 (20), 579,1535 (20)	
CWB.M					867,2116	2,31	579,1537 (25), 533,1126 (50), 409,0959 (40), 291,0893 (20), 289,0720 (40), 287,0579 (100)	
AL.V					291,0868	0,00	161,0627 (20), 147,0470 (30), 139,0416 (100), 123,0467 (70)	***epi-catequina
AL.M	4,20	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,0790	291,0868	291,0867	0,34	161,0623 (20), 147,0468 (30), 139,0414 (100), 123,0466 (70)	
CWB.V					291,0865	1,03	161,0607 (20), 147,0448 (30), 139,0401 (100), 123,0450 (80)	
CWB.M					291,0867	0,34	161,0604 (20), 147,0435 (30), 139,0404 (100), 123,0445 (90)	
AL.V					283,2269	1,41	305,2096 (100), 265,2169 (70), 247,2062 (35)	avocadinona
AL.M	8,50	C ₁₇ H ₃₀ O ₃	282,2195	283,2273	283,2281	-2,82	305,2094 (100), 265,2168 (60), 247,2060 (35)	
CWB.V					283,2281	-2,82	305,2096 (100), 265,2168 (60), 247,2061 (30)	
CWB.M					283,2263	3,53	305,2094 (100), 265,2165 (60), 247,2057 (30)	
AL.V					325,2369	3,07	347,2198 (100), 265,2164 (20), 247,2061 (15)	acetato de avocadinona
AL.M	9,43	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	324,2301	325,2379	325,2368	3,38	347,2199 (100), 265,2169 (20), 247,2059 (15)	
CWB.V					325,2367	3,69	347,2197 (100), 265,2165 (20), 247,2058 (15)	
CWB.M					325,2373	1,84	347,2199 (100), 265,2167 (15), 247,2061 (15)	

TABELA 4 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QToF-EM, ES⁺

(continua)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa calculada	[M+H] ⁺ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)		Substância sugerida
AL.V					285,2433	-1,40	307,2254 (70), 267,2332 (100), 249,2223 (35), 231,2119 (35)		avocado (1,2,4- trihidróxiheptadec- 16-ino)
AL.M	9,62	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	284,2351	285,2429	285,2429	0,00	307,2251 (70), 267,2328 (100), 249,2220 (40), 231,2114 (37)		
CWB.V					285,2437	-2,80	307,2250 (70), 267,2326 (100), 249,2218 (60), 231,2113 (50)		
CWB.M					285,2437	-2,80	307,2250 (70), 267,2326 (100), 249,2218 (60), 231,2113 (50)		
AL.V					327,2535	0,00	349,2359 (100), 309,2431 (20), 267,2328 (45), 249,2223 (50), 231,2117 (20)		acetato de avocado
AL.M					327,2528	2,14	349,2355 (100), 309,2431 (20), 267,2326 (50), 249,2219 (45), 231,2114 (25),		
CWB.V	9,75	C ₁₉ H ₃₄ O ₄	326,2457	327,2535	327,2528	2,14	349,2355 (100), 309,2428 (20), 267,2325 (50), 249,2219 (50), 231,2113 (25),		
CWB.M					327,2528	2,14	349,2355 (100), 309,2428 (20), 267,2325 (50), 249,2219 (50), 231,2113 (25),		
AL.V					287,2588	-0,70	309,2409 (50), 269,2487 (100), 251,2379 (60), 233,2274 (90)		avocado (16-heptadeceno- 1,2,4-triol)
AL.M	10,02	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	286,2508	287,2586	287,2588	-0,70	309,2407 (50), 269,2484 (100), 251,2376 (50), 233,2273 (90)		
CWB.V					287,2582	1,39	309,2408 (60), 269,2486 (100), 251,2378 (50), 233,2274 (98)		
CWB.M					287,258	2,09	309,2409 (50), 269,2485 (100), 251,2377 (50), 233,2274 (90)		
AL.V					329,2698	-1,82	351,2518 (100), 311,2590 (30), 269,2487 (60), 251,2378 (30), 233,2273 (50)		acetato de avocado (2,4- dihidróxiheptadec- 16-enil acetato)
AL.M					329,2693	-0,30	351,2514 (100), 311,2589 (40), 269,2483 (30), 251,2377 (25), 233,2273 (50)		
CWB.V	11,02	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	328,2614	329,2692	329,2701	-2,73	351,2517 (100), 311,2589 (60), 269,2483 (30), 251,2379 (40), 233,2275 (70)		
CWB.M					329,2683	2,73	351,2512 (100), 311,2587 (50), 269,2481 (30), 251,2375 (35), 233,2270 (50)		
AL.V					321,2796	-0,93	303,2686		1-hidróxiheicosa- 2,12,15-trien-4-ona
AL.M	11,09	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320,2715	321,2793	321,2796	-0,93	303,2688		
CWB.V					321,2796	-0,93	303,2688		
CWB.M					321,2795	-0,62	303,2683		
AL.V					355,2832	4,50	377,2641 (100), 337,2726 (30), 295,2652 (5)		persenona B
AL.M	11,74	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354,277	355,2848	355,2832	4,50	377,2667 (100), 337,2731 (30), 295,2630 (5)		
CWB.V					355,2843	1,41	377,2668 (100), 337,2735 (5), 295,2638 (80)		
CWB.M					355,2843	1,41	377,2664 (100), 337,2725 (30), 295,2623 (20)		

TABELA 4 – SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLUE-ESI-QToF-EM, ES⁺

(conclusão)

Amostra	tr (min)	Fórmula [M]	Massa calculada	[M+H] ⁺ m/z	Massa encontrada	Erro (ppm)	Fragmentos m/z (%)	Substância sugerida
AL.V					353,269	0,57	293,2484 (100), 275,2414 (20)	
AL.M	11,89	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	352,2614	353,2692	353,2697	-1,42	293,2486 (100), 275,2392 (20)	
CWB.V					353,2691	0,28	293,2475 (100), 275,2370 (40)	
CWB.M					353,2693	-0,28	293,2485 (100), 275,2380 (60)	
AL.V					339,2871	1,18	339,2881 (100), 299,2954 (30), 281,2845 (90), 263,2743 (35)	
AL.M	12,17	C ₁₉ H ₄₀ O ₃	316,2977	339,2875**	339,2887	-3,54	339,2885 (80), 299,2950 (40), 281,2850 (100), 263,2740 (45)	
CWB.V					339,2887	-3,54	339,2875 (100), 299,2949 (35), 281,2846 (90), 263,2737 (30)	
CWB.M					339,289	-4,42	339,2890 (100), 299,2951 (25), 281,2846 (60), 263,2737 (20)	1,2,4- triidróxinonadecano
AL.V					379,2827	5,54	301,1411	
AL.M	12,50	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	378,277	379,2848	379,2831	4,48	401,2653 (100), 301,1411 (60)	
CWB.V					379,2831	4,48	401,2668 (100), 301,1414 (10)	persenona A
CWB.M					379,2842	1,58	401,2672 (100), 301,1416 (5)	
AL.V					381,2983	5,77	263,2372	
AL.M	12,91	C ₂₃ H ₄₀ O ₄	380,2927	381,3005	381,2981	6,29	263,2374	
CWB.V					381,2983	5,77	303,2686 (100), 263,2365 (50)	persina
CWB.M					381,2986	4,98	303,2668 (100), 263,2373 (30)	

FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **[M+Na]⁺. *** Confirmado com padrão.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Sabe-se que o tamanho de partícula de um material pode influenciar na extração de substâncias, visto que as partículas menores têm uma área de superfície maior e, portanto, proporcionam uma taxa de transferência de massa maior (NAWAZ et al., 2005). Além disso, quanto menor o tamanho de partícula do material, menor a trajetória que o solvente tem para percorrer, o que indiretamente diminui o tempo máximo de extração dos fitoquímicos (NAWAZ et al., 2005). Sendo assim, o presente trabalho avaliou se o tempo de maceração e a granulometria influenciam na extração quantitativa e qualitativa das substâncias.

Água e outros solventes orgânicos (álcool etílico, acetonitrila, acetona, hexano e éter dietílico) são normalmente usados para extração de compostos bioativos, e como estes variam de muito polares a muito apolares, o solvente de extração desempenha um papel importante na eficiência da extração de compostos bioativos de materiais vegetais (DAILEY; VUONG, 2015). A diferença nas polaridades dos solventes pode influenciar a solubilidade dos constituintes químicos e o seu rendimento de extração. Desta forma, este estudo teve também como um dos seus objetivos investigar a influência do grau alcoólico do solvente utilizado na extração dos compostos das sementes de *P. americana*, bem como em seu perfil cromatográfico e espectrométrico.

A variação geográfica e de maturação pode alterar significativamente o perfil químico de uma droga vegetal, visto que envolvem alterações climáticas, de nutrientes, de proteção, e de sobrevivência da espécie no local. Neste estudo, foi realizado um planejamento fatorial a fim de variar condições de extração, maturação e geográficas, e avaliar a influência no perfil químico da *Persea americana* bem como no seu potencial anti-inflamatório. A partir de análise quimiométrica por análise de componentes principais foi possível determinar padrões de similaridades bem como possíveis sinais espectrométricos que diferenciam as amostras entre si.

O objetivo do planejamento é fundamentado no uso popular das sementes do abacate, que variam sua forma de preparo em diferentes comunidades. Sendo assim, o resultado desta pesquisa direciona a melhor condição para reaproveitamento deste subproduto do abacate que é atualmente descartado. Realizando as extrações a partir do planejamento fatorial, e em triplicata, foram analisadas em CLUE-ESI-QToF-EM

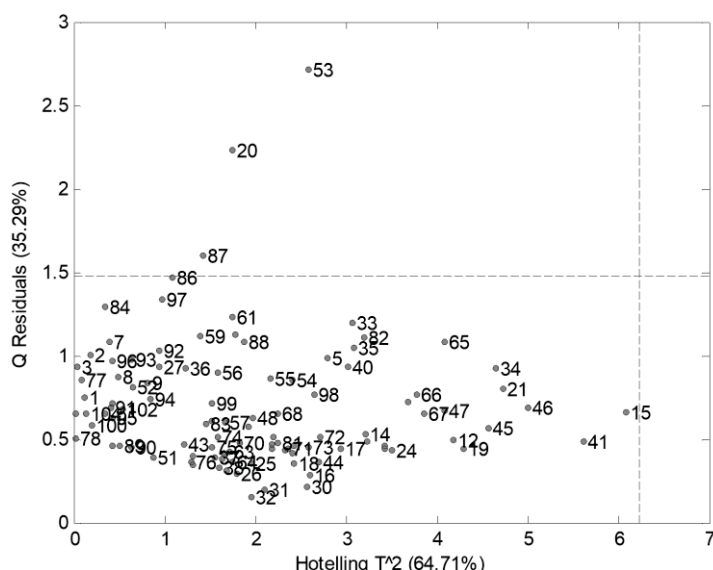
106 amostras, visto que na hora da análise foram perdidas 2 amostras (uma réplica da amostra CWB.v condição 9, e uma réplica da amostra AL.v condição 9).

A partir do pré-tratamento dos dados gerou-se uma matriz 106 x 586 a qual foi aplicado o algoritmo da análise de componentes principais (ACP). Foram detectados 586 íons no modo positivo de ionização (apresentando a maior quantidade de íons) e 30 no modo negativo. Desta forma, utilizou-se os dados obtidos por CLUE-ESI-QToF-EM no modo positivo, tendo em vista o maior número de íons.

Os gráficos de escores, bem como as tabelas, com os números referentes a cada amostra encontram-se no APÊNDICE 2 – páginas 139-144.

Para avaliar a presença de amostras que tenham uma alta probabilidade de serem anômalas, foram considerados limites com 99,9% de confiança e analisou-se o gráfico dos valores obtidos para os parâmetros T2 de Hotelling e resíduos Q. Tendo em vista que apenas as amostras localizadas no quadrante superior direito dos gráficos de resíduos são amostras anômalas, no APC com todas as amostras extraídas nas condições apresentadas no planejamento fatorial (TABELA 1), é possível notar a ausência de amostras anômalas (FIGURA 18).

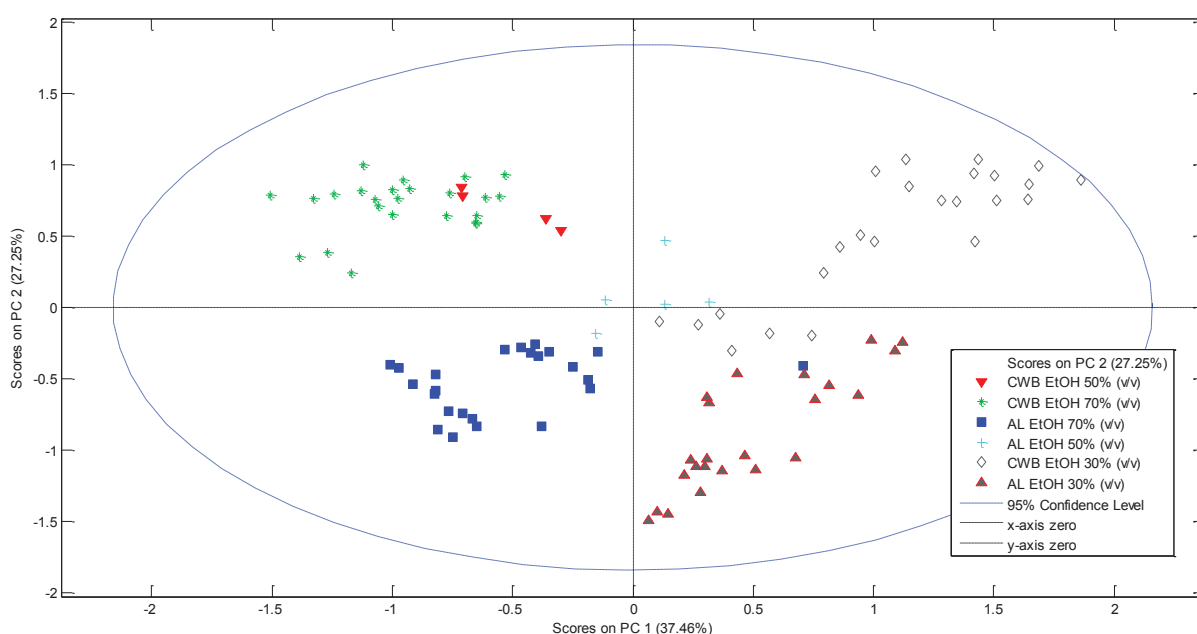
FIGURA 18 – GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

Desta forma, processou-se o ACP reunindo todas as amostras do planejamento fatorial, sendo que o gráfico de escores obtido demonstra que as duas primeiras componentes do ACP explicam 64,71% da variância total (37,46% por componente 1 e 27,25% por componente 2). A primeira componente (CP1) discrimina as amostras em solvente de extração por álcool etílico 70% (v/v) e extração por álcool etílico 30% (v/v), enquanto a segunda componente discrimina as amostras por região de coleta, Curitiba (CWB) e Rosário do Ivaí (AL), com exceção das amostras (1, 2, 3, 7, 8 e 9) que são amostras AL e se encontram no quadrante das amostras CWB (FIGURA 19).

FIGURA 19 – GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

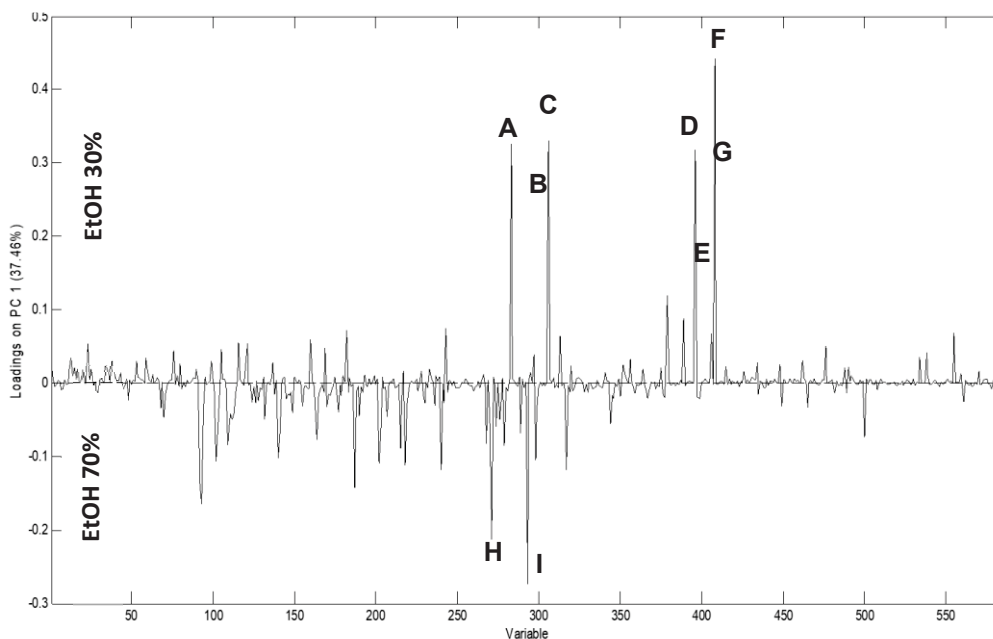


FONTE: A autora (2019).

Observando o gráfico de pesos (FIGURA 20) referente à CP 1, observou-se que no lado positivo foram agrupadas as amostras extraídas por álcool etílico 30% (v/v), sendo discriminadas das amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v) que foram agrupadas no lado negativo. Esta separação ocorreu devido à presença dos íons correspondentes à m/z 368,4260, m/z 413,2671, m/z 405,2984, m/z 522,5984, m/z 531,4087, m/z 553,3906 e m/z 550,6298 os quais apresentaram-se mais intensos em amostras extraídas em álcool etílico 30% (v/v). Já as amostras extraídas por álcool

etílico 70% (v/v), apresentaram como íons mais intensos os referentes ao acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e a m/z 393,2612.

FIGURA 20 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

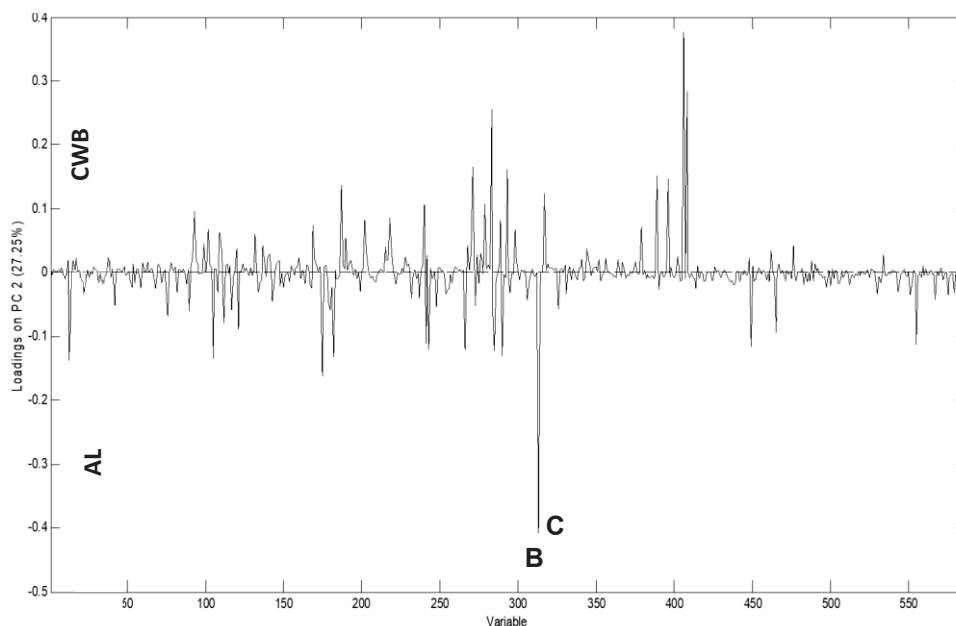


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A= m/z 368,4260, B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, D= m/z 522,5984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e I= m/z 393,2612.

Analisando-se o gráfico de pesos referente à CP2 (FIGURA 21) observou-se que as discriminações ocorreram devido aos íons mais intensos referentes a m/z 413,2671 e m/z 405,2984 presentes nas amostras de Rosário do Ivaí, as agrupando no lado negativo e as discriminado das amostras de Curitiba que foram agrupadas no eixo positivo.

FIGURA 21 -GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

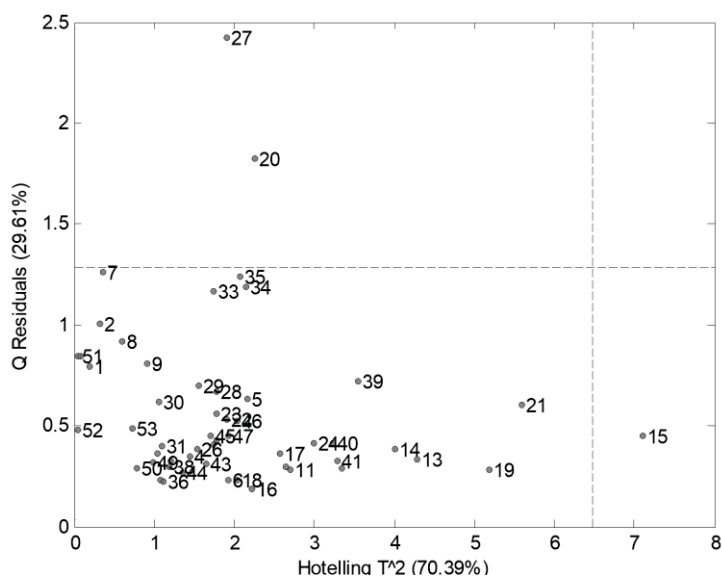


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984

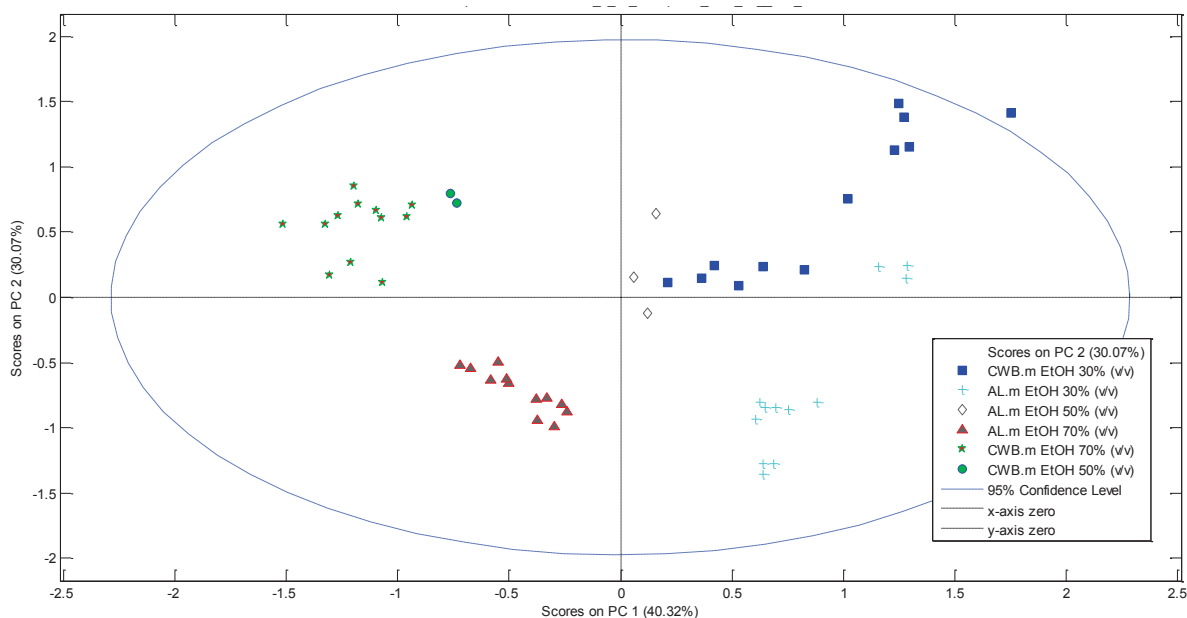
Aplicando-se o algoritmo da ACP para as amostras maduras de ambas localizações de coleta (AL.m e CWB.m), o gráfico de resíduos não apresentou nenhuma amostra anômala (FIGURA 22). Analisando o gráfico de escores, as duas primeiras componentes explicam 70,39% da variância total (40,32% por componente 1 e 30,07% por componente 2) no gráfico de escores (FIGURA 23). A primeira componente (CP1) discrimina as amostras em extração por álcool etílico 70% (v/v) e extração por álcool etílico 30% (v/v), enquanto que a segunda componente discrimina as amostras por região de coleta.

FIGURA 22 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 23 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

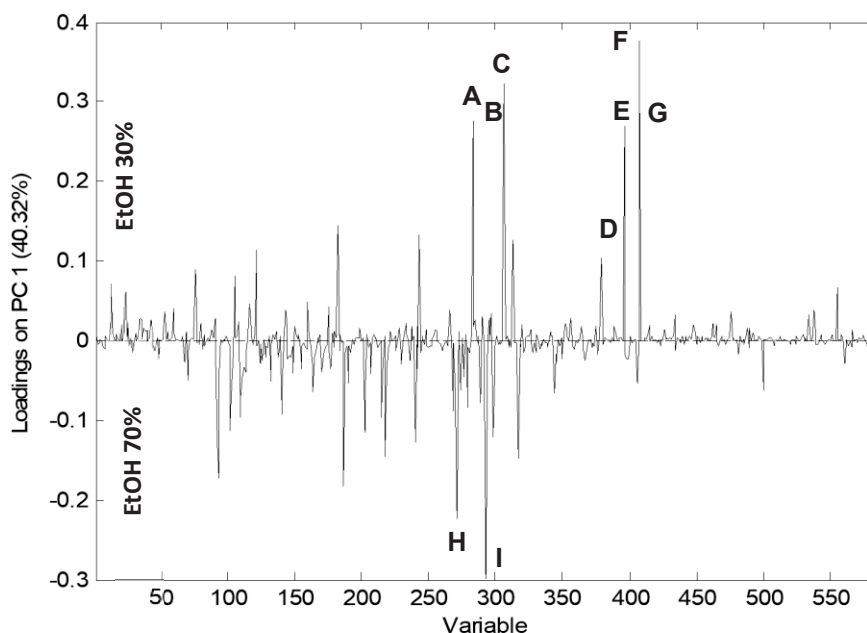


FONTE: A autora (2019).

Observando o gráfico de pesos (FIGURA 24) referente à CP 1, observou-se que no lado positivo foram agrupadas as amostras extraídas por álcool etílico 30% (v/v), sendo discriminadas das amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v) que

foram agrupadas no lado negativo. Esta discriminação ocorreu devido as suas semelhanças e à presença dos íons correspondentes à m/z 368,4260, m/z 413,2671, m/z 405,2984, m/z 522,5984, m/z 531,4087, m/z 553,3906 e m/z 550,6298 os quais apresentaram-se mais intensos em amostras extraídas em álcool etílico 30% (v/v), as discriminando das amostras extraídas por álcool etílico 70% (v/v) que apresentaram como íons mais intensos os referentes ao acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e a m/z 393,2612.

FIGURA 24 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

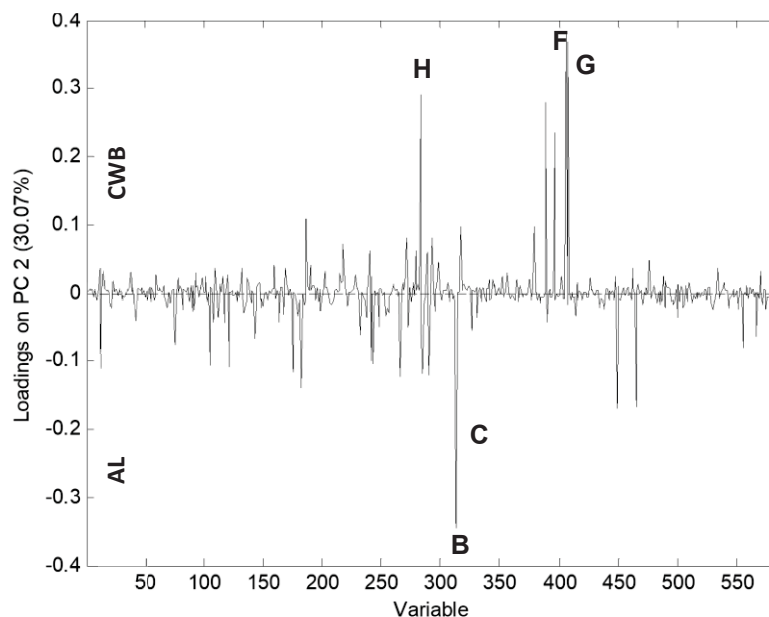


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A= m/z 368,4260, B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, D= m/z 522,5984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e I= m/z 393,2612.

Analisando-se o gráfico de pesos referente à CP2 (FIGURA 25) observou-se que as amostras foram discriminadas por região de coleta, em que devido a intensidade dos íons referentes a m/z 553,3906, m/z 550,6298 e acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ presentes nas amostras de Curitiba, estas amostras foram agrupadas no lado positivo e discriminadas das amostras de Rosário do Ivaí que foram agrupadas no lado negativo devido as suas semelhanças e presença dos íons mais intensos referentes as m/z 413,2671 e m/z 405,2984.

FIGURA 25 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

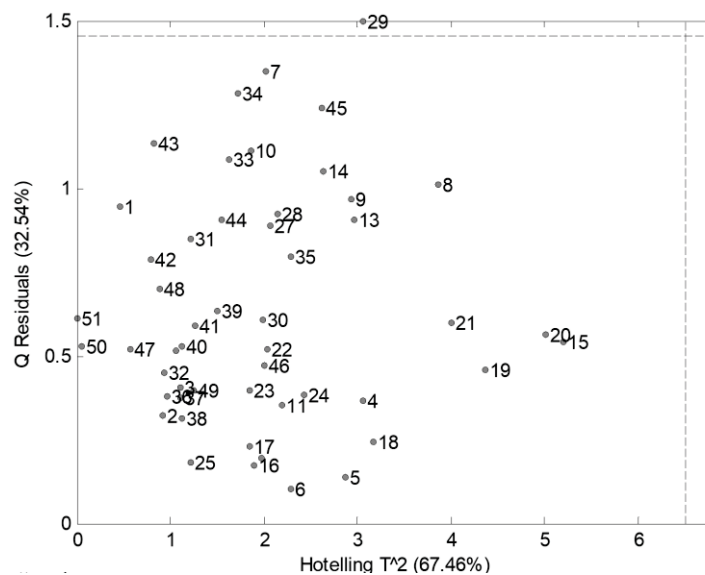


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$.

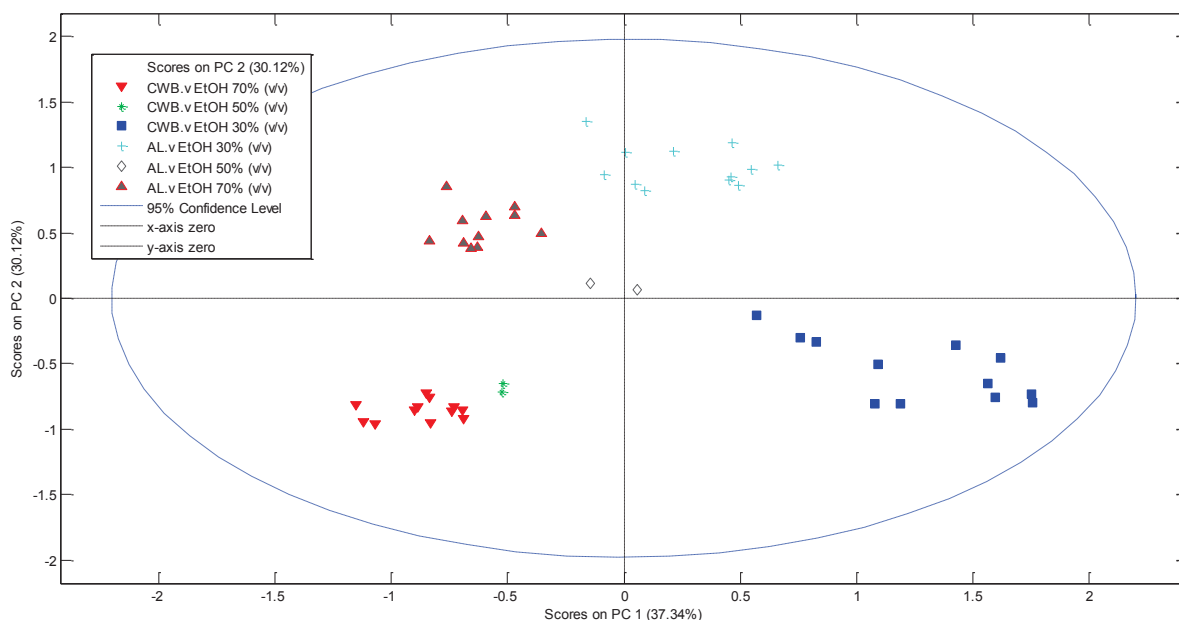
Quando o algoritmo da ACP aplicado as amostras verdes de ambas localizações de coleta (CWB.v e AL.v) o gráfico de resíduos não apresentou nenhuma amostra anômala (FIGURA 266). Analisando o gráfico de escores, as duas primeiras componentes explicam 67,46% da variância total (37,34% por componente 1 e 30,12% por componente 2) no gráfico de escores (FIGURA 27). A primeira componente (CP1) discrimina as amostras em extração por álcool etílico 70% (v/v) e extração por álcool etílico 30% (v/v) enquanto a segunda componente discrimina as amostras por região de coleta.

FIGURA 26 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 27 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

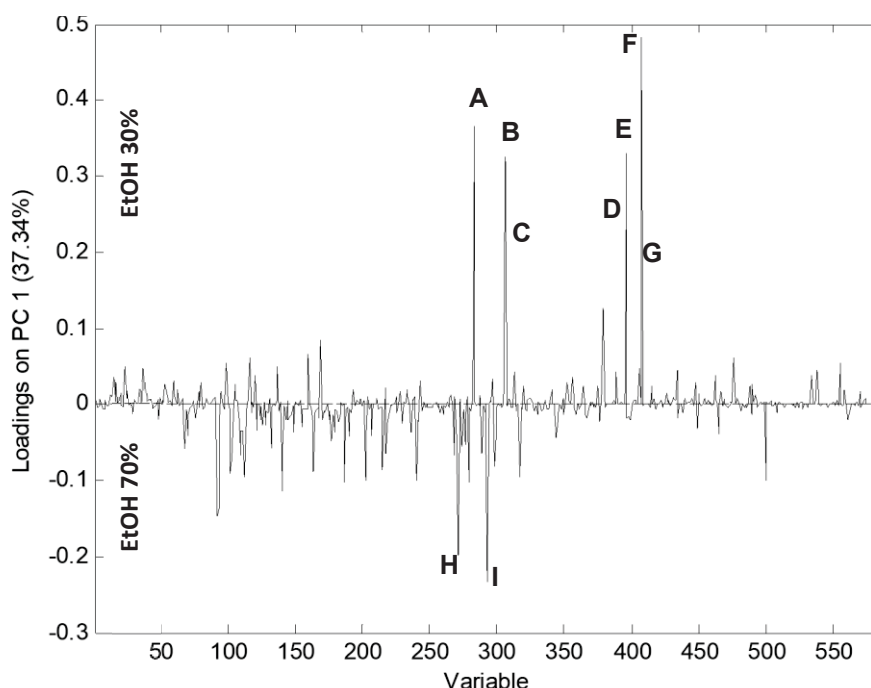


FONTE: A autora (2019).

Observando o gráfico de pesos (FIGURA 28) referente à CP 1, observou-se que ao lado positivo foram agrupadas as amostras extraídas por álcool etílico 30% (v/v), sendo discriminadas das amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v) que foram agrupadas no lado negativo. Esta separação ocorreu devido à presença dos

íons correspondentes à m/z 368,4260, m/z 413,2671, m/z 405,2984, m/z 522,5984, m/z 531,4087, m/z 553,3906 e m/z 550,6298, os quais apresentaram-se mais intensos em amostras extraídas em álcool etílico 30% (v/v), as discriminando das extraídas por álcool etílico 70% (v/v) que apresentaram como íons mais intensos os referentes ao acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e a m/z 393,2612.

FIGURA 28 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

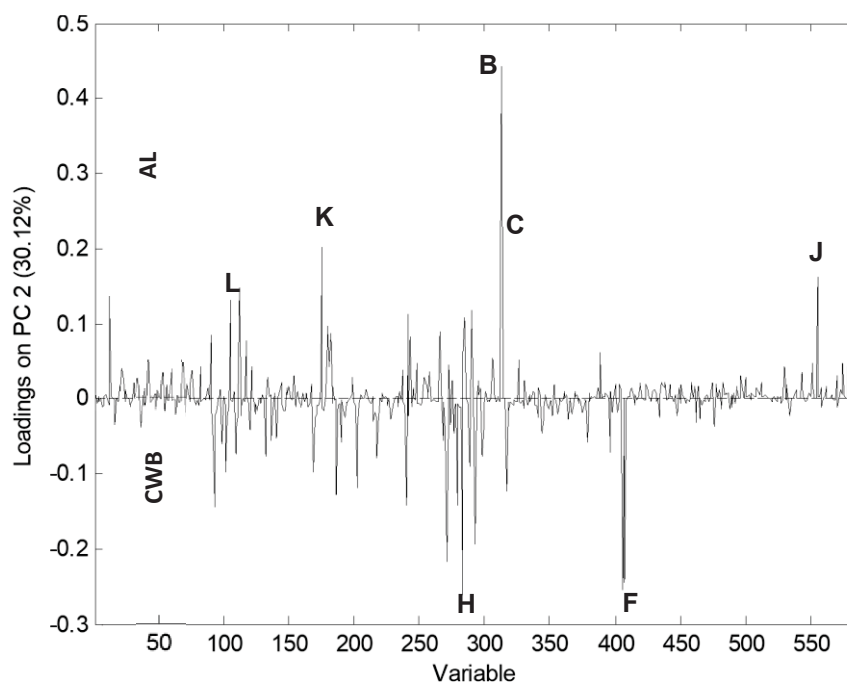


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A= m/z 368,4260, B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, D= m/z 522,5984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e I= m/z 393,2612.

Analisando-se o gráfico de pesos referente à CP2 (FIGURA 29) observou-se que as amostras foram discriminadas de acordo com sua localização de coleta, sendo que devido as suas semelhanças e presença dos íons mais intensos referentes a m/z 413,2671, m/z 405,2984, procianidina trímero A m/z 865,1968 $[M+H]^+$, catequina m/z 291,0866 $[M+H]^+$ e avocadino m/z 267,2325 $[M+H-H_2O]^+$, presentes nas amostras de Rosário do Ivaí estas foram agrupadas ao lado negativo e discriminadas das amostras de Curitiba que foram agrupadas no lado positivo, devido as suas semelhanças e presença dos íons mais intensos referentes à m/z 553,3906 e m/z 351,2511.

FIGURA 29 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

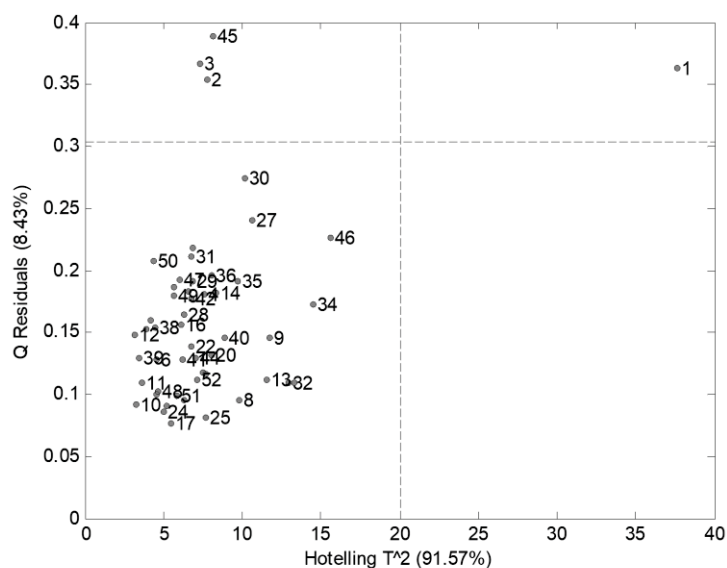


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, F= m/z 553,3906, H= m/z 351,2511, J= procianidina trímico A m/z 865,1968 $[M+H]^+$, K= catequina m/z 291,0866 $[M+H]^+$, L= avocadino m/z 267,2325 $[M+H-H_2O]^+$.

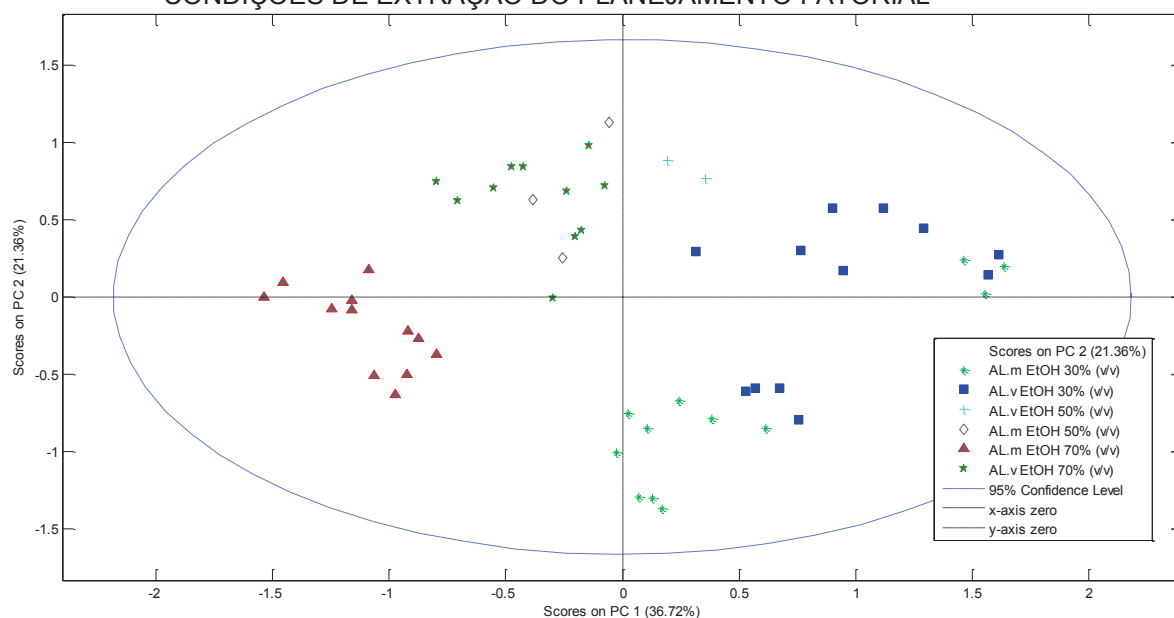
O gráfico de resíduos gerado na aplicação do algoritmo da ACP às amostras provenientes de Rosário do Ivaí e em diferentes tempos de maturação (AL.v e AL.m), apresentou apenas uma amostra anômala (FIGURA 30FIGURA 30FIGURA 26). O gráfico de escores explica 58,08% da variância total pelas duas primeiras componentes (36,72% por componente 1 e 21,36% por componente 2) (FIGURA 31). A primeira componente (CP1) discrimina as amostras em extração por álcool etílico 70% (v/v) e extração por álcool etílico 30% (v/v), enquanto a segunda componente discrimina as amostras por tempo de maturação.

FIGURA 30 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 31 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

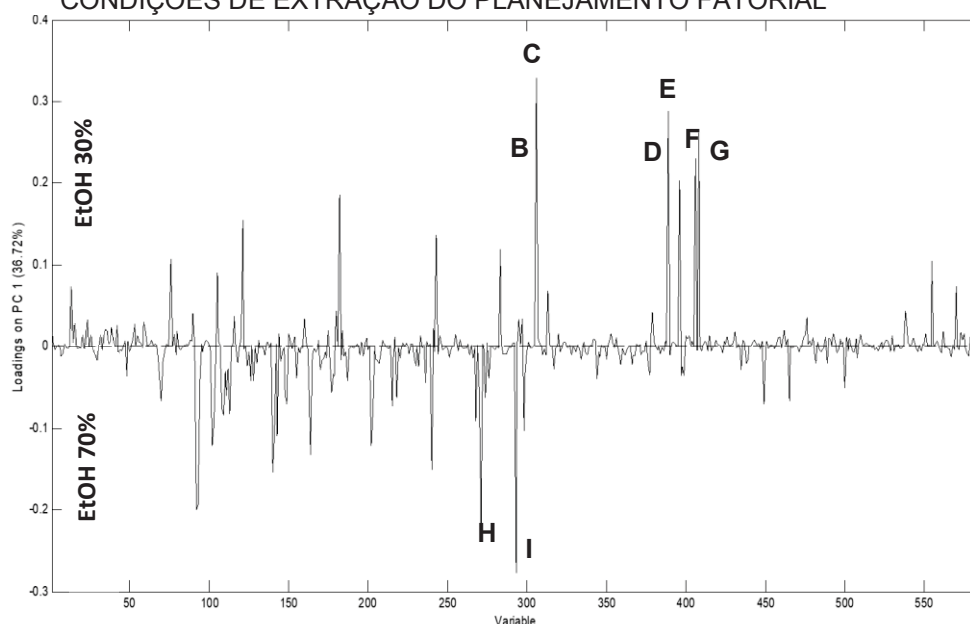


FONTE: A autora (2019).

Observando o gráfico de pesos (FIGURA 32) referente à CP 1, observou-se que ao lado positivo foram agrupadas as amostras extraídas por álcool etílico 30% (v/v), sendo discriminadas das amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v) que

foram agrupadas ao lado negativo. Esta separação ocorreu devido à presença dos íons correspondentes à m/z 368,4260, m/z 413,2671, m/z 405,2984, m/z 522,5984, m/z 531,4087, m/z 553,3906 e m/z 550,6298 os quais apresentaram-se mais intensos em amostras extraídas em álcool etílico 30% (v/v), as discriminando das amostras extraídas por álcool etílico 70% (v/v) que apresentaram como íons mais intensos os referentes ao acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e a m/z 393,2612.

FIGURA 32 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

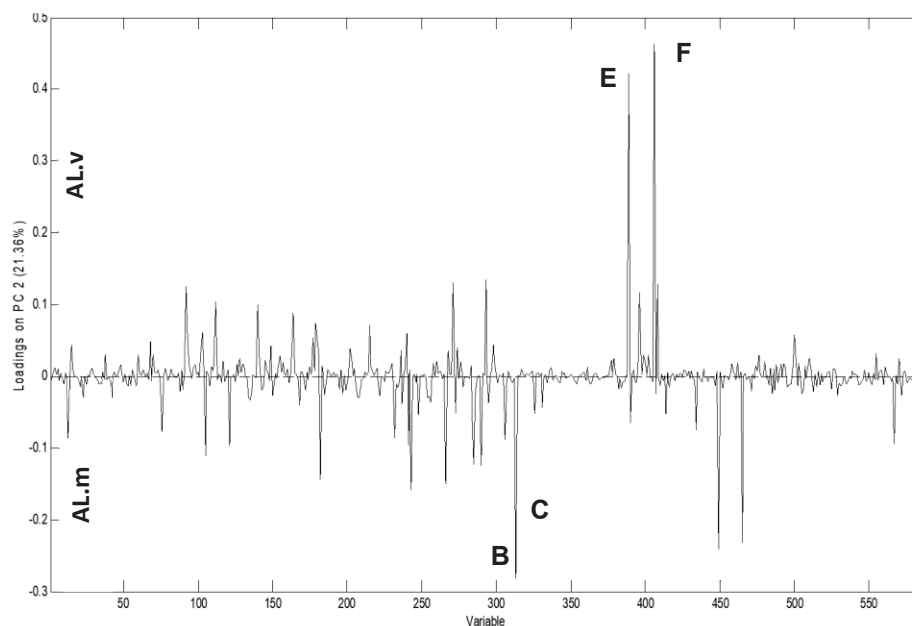


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, D= m/z 522,5984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e I= m/z 393,2612.

Analisando-se os gráficos de pesos (FIGURA 33), a CP 2 discriminou as amostras entre maduras e imaturas. As amostras imaturas foram agrupadas ao lado positivo devido as suas semelhanças e presença dos íons mais intensos referentes a m/z 531,4087 e m/z 553,3906 as discriminando das amostras maduras que foram agrupadas ao lado negativo devido as suas semelhanças e presença dos íons mais intensos referentes m/z 413,2671 e m/z 405,2984.

FIGURA 33 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

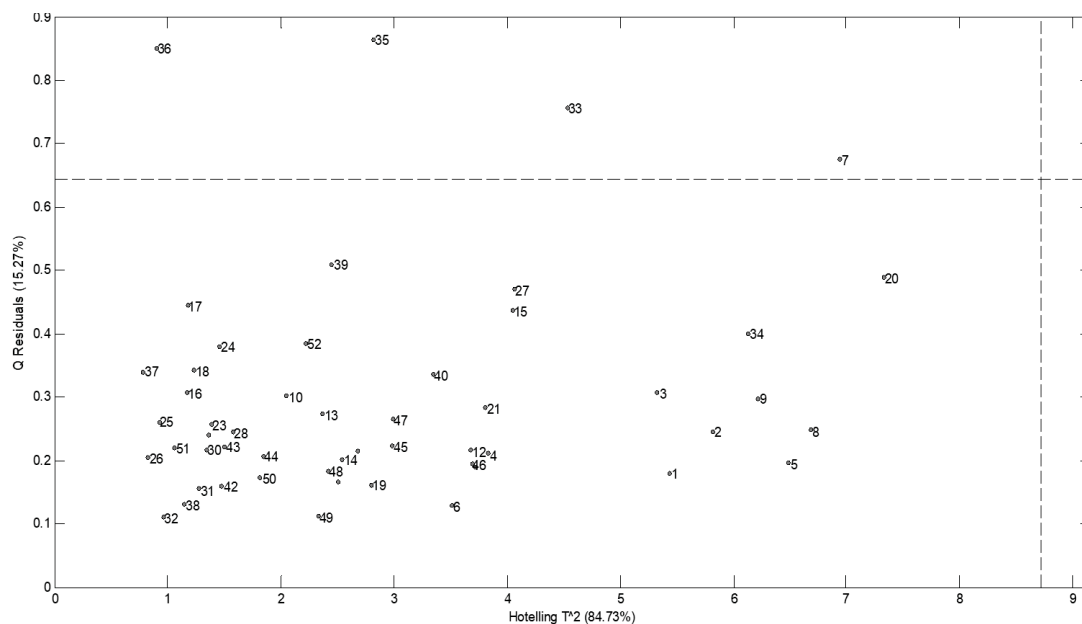


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906.

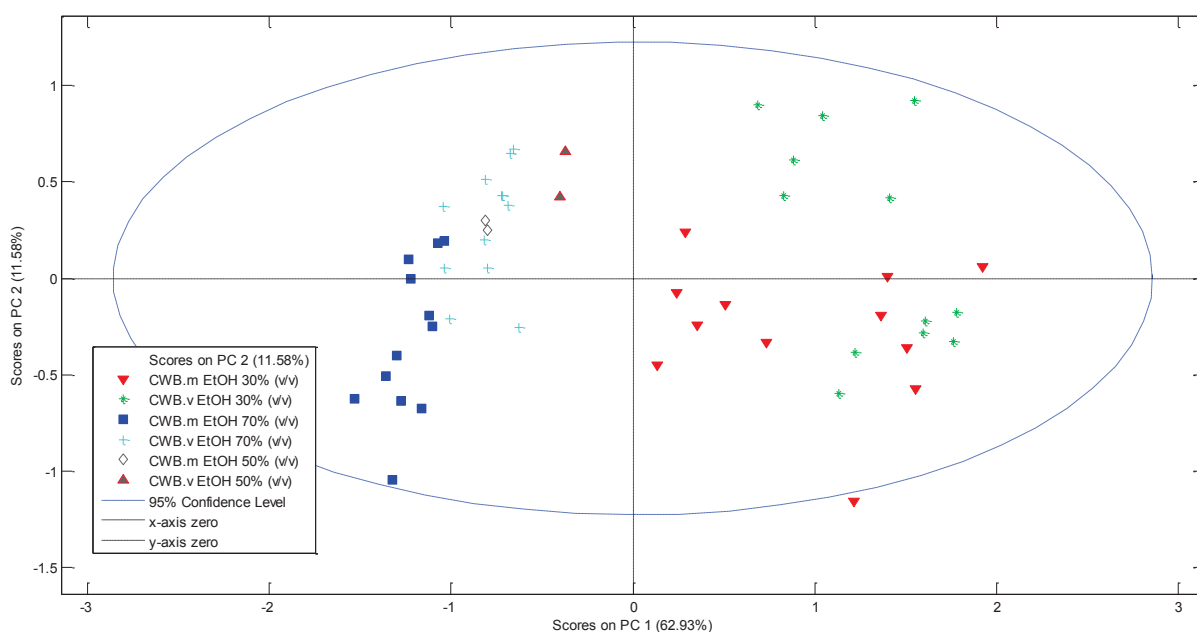
Analisando-se o gráfico de resíduos gerado na aplicação do algoritmo da ACP às amostras provenientes de Curitiba e em diferentes tempos de maturação (CWB.v e CWB.m), este não apresentou amostras anômalas (FIGURA 26) (FIGURA 34). No gráfico de escores as duas primeiras componentes explicam 74,51% da variância total (62,93% por componente 1 e 11,58% por componente 2) (FIGURA 35). A primeira componente (CP1) discrimina as amostras em extração por álcool etílico 70% (v/v) e extração por álcool etílico 30% (v/v), enquanto a segunda componente discrimina as amostras por tempo de maturação.

FIGURA 34 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 35 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

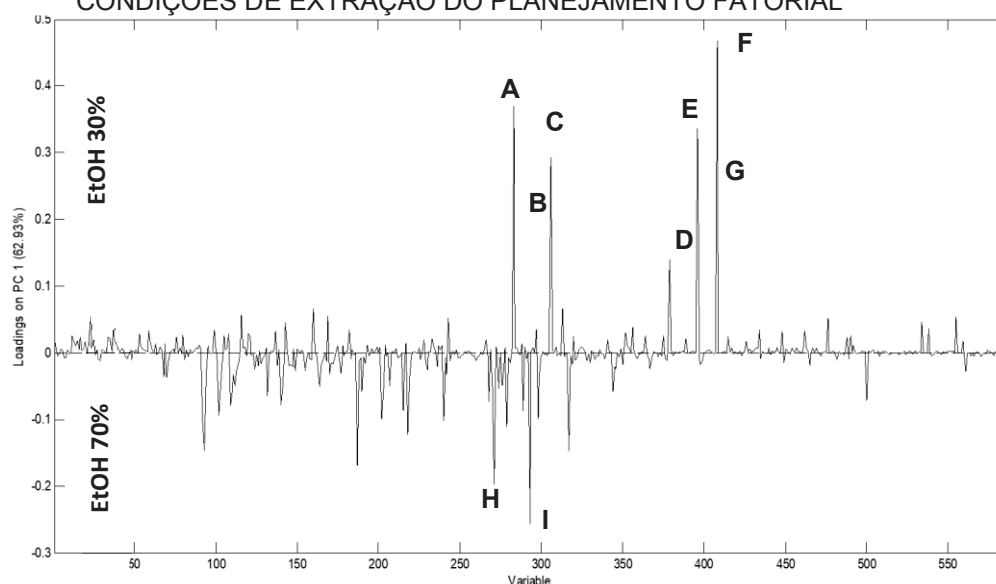


FONTE: A autora (2019).

Observando o gráfico de pesos (FIGURA 36) referente à CP 1, observou-se que ao lado positivo foram agrupadas as amostras extraídas por álcool etílico 30%

(v/v), sendo discriminadas das amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v) que foram agrupadas ao lado negativo. Esta separação ocorreu devido à presença dos íons correspondentes à m/z 368,4260, m/z 413,2671, m/z 405,2984, m/z 522,5984, m/z 531,4087, m/z 553,3906, m/z 550,6298 os quais apresentaram-se mais intensos em amostras extraídas em álcool etílico 30% (v/v), as discriminando das extraídas por álcool etílico 70% (v/v) que apresentaram como íons mais intensos os referentes ao acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e a m/z 393,2612.

FIGURA 36 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

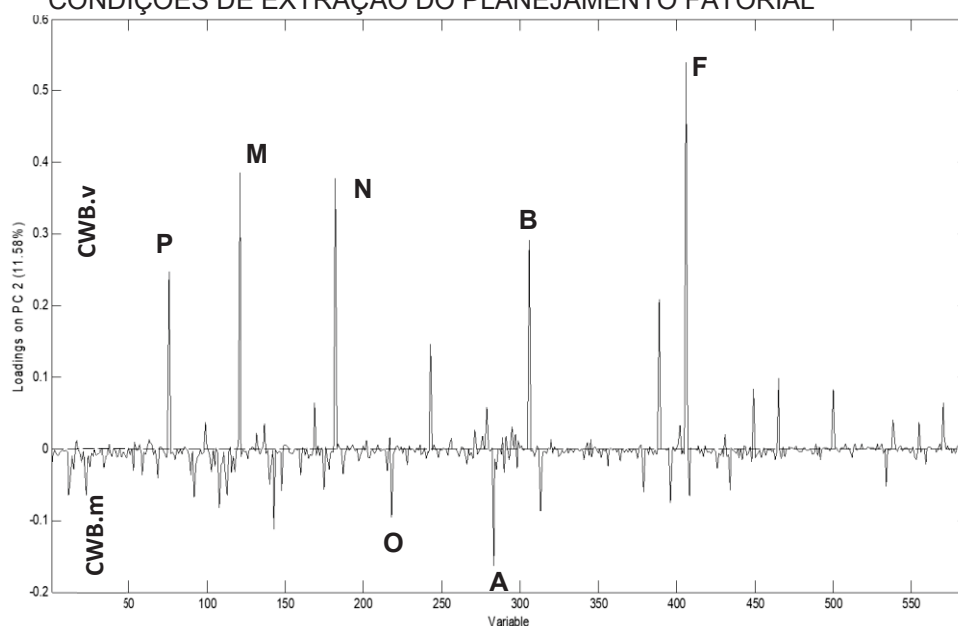


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A= m/z 368,4260, B= m/z 413,2671, C= m/z 405,2984, D= m/z 522,5984, E= m/z 531,4087, F= m/z 553,3906, G= m/z 550,6298, H= acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ e I= m/z 393,2612.

Analisando-se os gráficos de pesos referente à CP 2 (FIGURA 37), esta discriminou as amostras entre maduras e imaturas, a partir dos íons mais intensos presentes nas amostras maduras referentes as m/z 368,4260 e 1-hidróxiheneicosa-2,12,15 trien-4-ona m/z 321,2793 $[M+H]^+$ agrupando-as ao lado negativo e aos íons referentes as m/z 413,2671, m/z 553,3906, m/z 267,2325, m/z 305,1580 e m/z 217,1056 nas amostras imaturas as agrupando ao lado positivo.

FIGURA 37 - GRÁFICO DE PESOS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A= m/z 368,4260, B = m/z 413,2671, F= m/z 553,3906, M= m/z 267,2325, N= m/z 305,1580, O= 1-hidróxiheicosa-2,12,15 trien-4-ona m/z 321,2793 $[M+H]^+$, P= m/z 217,1056.

A discriminação das amostras através da análise de componentes principais demonstrou que os íons de m/z 405,2984, m/z 413, 2671, m/z 368,4260, m/z 531,4087, m/z 522,5984, m/z 553,3906 e m/z 550,6298, são encontradas predominantemente em extratos hidroalcoólicos 30% (v/v) de sementes de *P. americana* sendo os principais íons que os distinguem de extratos hidroalcoólicos 70% (v/v). Enquanto os íons de m/z 393,2612 e acetato de avocadeno m/z 351,2511 $[M+Na]^+$ foram predominantes em amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v). Os íons de m/z 267,2325 e m/z 305,1580 são predominantes em amostras imaturas de Curitiba enquanto a catequina m/z 291,0866, procianidina trímero A m/z 865,1968 e avocadino m/z 267,2325 são predominantes em amostras imaturas de Rosário do Ivaí. As amostras extraídas em álcool etílico 50% (v/v) estiveram sempre agrupadas às amostras extraídas em álcool etílico 70% (v/v), demonstrando que não houve diferenciação destas.

Portanto, através da avaliação dos gráficos da ACP obtido com todas as amostras do planejamento fatorial, verifica-se que fatores geográficos e teor de álcool etílico são fatores que demonstram influenciar no perfil dos extratos das sementes de *P. americana*.

Entretanto, a granulometria do pó não teve influência na discriminação dos extratos e o tempo de maceração também não influenciou na discriminação das amostras, implicando um provável esgotamento da extração das substâncias em até 24 horas.

Dentre as substâncias identificadas, algumas já foram relatadas na literatura quanto ao potencial anti-inflamatório ou antioxidante. As persenonas A e B apresentaram atividade inibitória na geração de superóxido de nitrogênio e óxido nítrico (KIM;MURAKAMI;NAKAMURA; et al., 2000; KIM;MURAKAMI;TAKAHASHI; et al., 2000). WANG; CHEN; WANG (2017) demonstraram a diminuição de TNF, IL-6 e IL-10 por procianidinas do tipo B, enquanto que procianidinas B2 inibem a expressão de COX-2 (GONZÁLEZ et al., 2011). Procianidinas oligoméricas auxiliam na formação de colágeno, ainda que os monômeros são incapazes de auxiliar nessa atividade (NAWAZ et al., 2005). Além disso, as oligoméricas apresentam estruturas favoráveis a captação de radicais livres (UPADHYAY et al., 2010).

Os flavonoides em geral são conhecidos pelas suas atividades antioxidante e consequentemente anti-inflamatória, atuando na expressão de IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral, assim como na atividade de enzimas pró-inflamatórias, expressão gênica relacionada à inflamação, inibição da transcrição de fatores nucleares como NF- κ B e poder inibitório de síntese de iNOS induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos (PAN; LAI; HO, 2010; SILVA et al., 2015; SHAHIDI; YEO, 2018). DOMÍNGUEZ et al. (2011) demonstram o potencial anti-inflamatório do composto penstemida em um estudo preliminar. Sendo assim, as sementes de *P. americana* podem apresentar atividade anti-inflamatória devido à sua composição química descrita neste trabalho.

4.5 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*.

4.5.1 Determinação da concentração de extrato bruto utilizada para tratamento das células RAW 264.7.

Macrófagos são importantes células moduladoras do processo inflamatório e desempenham papel crucial no desenvolvimento da inflamação e cronificação do

processo patológico. Com o objetivo de investigar a influência do extrato de sementes de abacate sobre a ativação de macrófagos *in vitro*, foram utilizadas células RAW 264.7.

O ensaio de citotoxicidade por redução do sal de tetrazólio (MTT), tem como objetivo detectar o potencial dos extratos em produzir efeitos letais ou subletais sobre as células, sendo uma técnica quantitativa que revela a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio determina o número de células viáveis a partir da quantificação de atividade mitocondrial, medindo a formação de cristais insolúveis de formazan que se formam a partir da conversão de MTT ((3- [4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio) por enzimas mitocondriais oxidoredutase NAD(p)H dependentes. Células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT no produto formazan de cor púrpura com uma absorbância máxima próxima a 570 nm. Quando as células morrem elas perdem esta capacidade, de maneira que a formação da cor serve como um marcador útil e conveniente (MOSMANN, 1983; AYSUN; YAĞMUR; YUSUF, 2016; RISS et al., 2016).

O uso mais comum para este ensaio é para detectar efeitos citotóxicos de diferentes agentes sob diferentes condições ou diferentes concentrações. Desta forma, foi escolhido para a avaliação da função inflamatória dos macrófagos a fim de determinar a concentração dos extratos a ser utilizada nos tratamentos. Considerou-se como concentração ideal aquela que preservou a viabilidade celular acima de 90% associada à mínimas alterações morfológicas. Sabendo-se que sempre há uma porcentagem de morte celular, a adoção de viabilidade acima de 90% aumenta a confiabilidade e evita impacto e alteração na interpretação dos resultados dos ensaios.

Devido a inviabilidade de testar todos as condições de extração do planejamento fatorial, foram selecionadas a condição **(1)** (EtOH 30% (v/v), pó finíssimo, 24h), **(8)** (EtOH 70% (v/v), pó grosso, 168h) e **(9)** (EtOH 50%, pó semifino, 72h) de cada amostra AL.v, AL.m, CWB.v e CWB.m. Analisando-se os pontos extremos e médio do planejamento fatorial torna-se possível a investigação da influência dos fatores de extração nas atividades biológicas dos extratos. Os extratos preservaram a viabilidade celular acima de 90% até a concentração de 750 µg/mL, com exceção dos pertencentes ao grupo **(8)** que apresentaram efeito citotóxico a partir de 500 µg/mL (GRÁFICO 1). Esta diferença pode ter ocorrido em detrimento das condições de extração a que cada extrato foi submetido, que pode levar a extração qualitativa e/ou quantitativa distinta de substâncias bioativas. Esta diferença pode ser

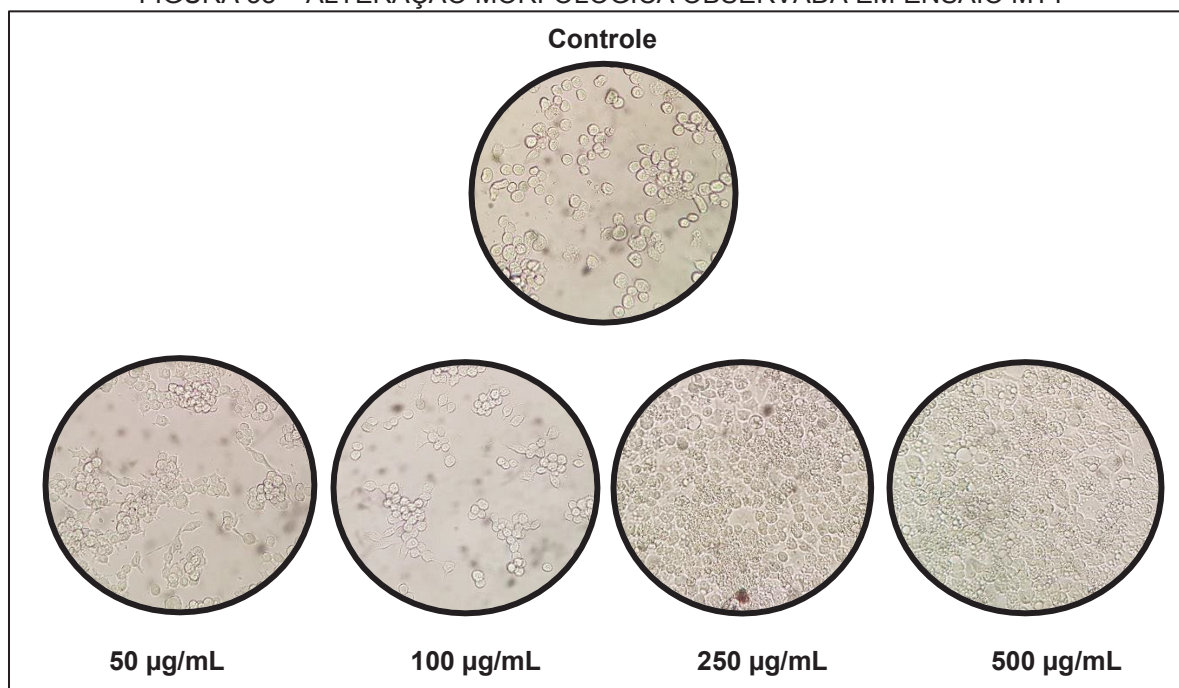
vista comparando-se visualmente os cromatogramas de cada extrato utilizado, cujas figuras se encontram no APÊNDICE 1. Através de observação por microscopia óptica convencional em aumento de 400 vezes notou-se também que todos os extratos promoveram alterações morfológicas como vacuolização e sinais de sofrimento celular em concentrações maiores que 250 µg/mL, representadas na FIGURA 38. Por estas alterações de indicativo de sofrimento celular determinou-se 100 µg/mL como concentração confiável de trabalho para os tratamentos posteriores.

O uso tradicional de extratos hidroalcoólicos de sementes de *P. americana* para alívio de dor articular levou a investigação de seu potencial anti-inflamatório, entretanto, ainda são poucos os estudos que investigam seu potencial *in vitro*. Dentre estes, a viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) quando tratados com extratos de sementes hidroalcoólicos 80% (v/v), extraídos por sonicação (15 min.), se manteve até a concentração de tratamento de 10 µg/mL (TREMOCOLDI et al., 2018). Porém, os autores não especificam qual a porcentagem de células que foi considerada como parâmetro de viabilidade. Ainda que investigaram extratos de cascas e sementes, não apresentam em qual concentração os extratos específicos de sementes tornaram-se citotóxicos. Algumas diferenças na metodologia aplicada por TREMOCOLDI et al. (2018) podem estar relacionadas à diferença na citotoxicidade dos extratos como: a variedade (Hass e Fuerte), tempo de maturação e região de coleta da droga vegetal utilizada, a metodologia de extração, bem como o tempo de incubação das células com os extratos (48h). Como os autores identificaram apenas cinco substâncias bioativas, é impossível comparar a composição química que possivelmente é responsável pela diferença na citotoxicidade comparada a este trabalho.

JESUS et al. (2015) investigaram a citotoxicidade de extrato glicólico comercial de *P. americana* que apresentou viabilidade celular abaixo de 60% na concentração de 50 µg/mL. Como não são descritas informações sobre o material vegetal bem como metodologia de extração devido a utilização de um extrato comercial, há várias circunstâncias que podem justificar a diferença na citotoxicidade sobre as células RAW 264.7. HONG et al. (2019) relatam a viabilidade celular dos macrófagos quando tratados com extrato hidroalcoólico 30% (v/v) de polpa a qual se manteve acima de 80% (v/v) até a concentração de 200 µg/mL. LEITE et al. (2009) investigaram a toxicidade de extratos hexânico e metanólico das sementes de abacate frente à *Artemia salina* que apresentou os valores de CL50 2,37 e 24,13 mg/L,

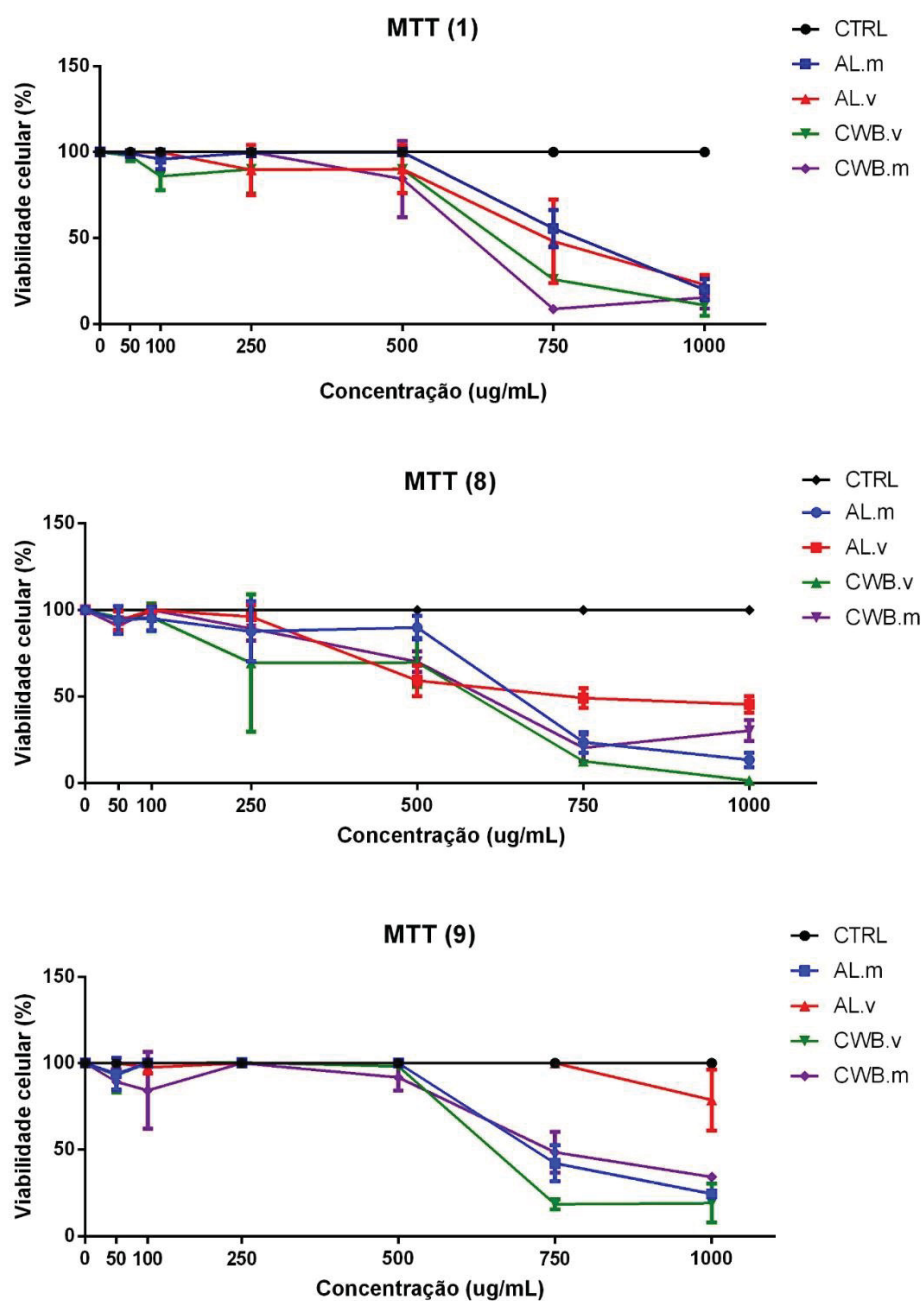
demonstrando a baixa toxicidade dos extratos de sementes. Em resumo, diferenças nas partes da droga vegetal utilizada, bem como região de coleta, variedade, maturação e metodologia de extração, influenciam na composição química do extrato que consequentemente podem influenciar no grau de toxicidade.

FIGURA 38 – ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA OBSERVADA EM ENSAIO MTT



FONTE: A autora (2019).

GRÁFICO 1—DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO IDEAL POR MÉTODO DE MTT



FONTE: A autora (2019).

4.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com extratos hidroalcoólicos de sementes de *P. americana*.

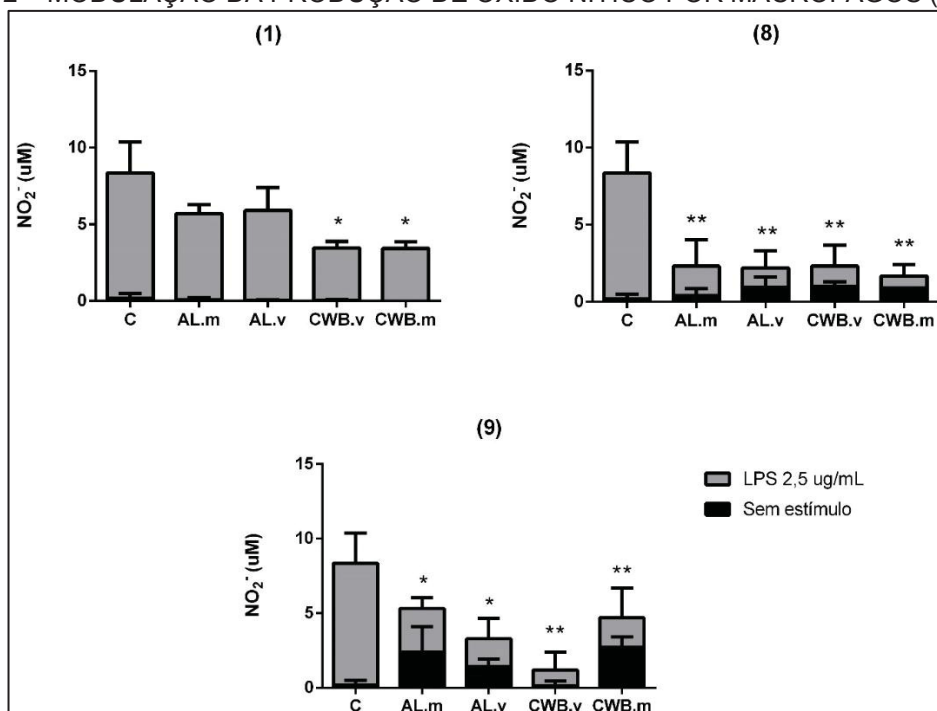
O óxido nítrico (NO) é um gás incolor sintetizado e liberado pelas células endoteliais e macrófagos e reconhecido como um dos componentes mais versáteis

do sistema imunológico. Sua síntese é regulada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). O NO é uma molécula difusível, que está envolvida em condições fisiológicas como na modulação do fluxo sanguíneo e atividade neural, e patológicas como no mecanismo de defesa imunológica, controle de doenças infecciosas, tumores, processos auto-imunes, doenças degenerativas crônicas, além de desempenhar um papel crucial no processo inflamatório (BOGDAN, 2001; PREDONZANI et al., 2015). Dentre as ações principais que desempenha na inflamação, está a vasodilatação e ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). Apesar de ser um mecanismo de defesa, em várias situações a resposta inflamatória pode ser exacerbada, em cujo caso as células de defesa do sistema imune podem atacar o hospedeiro. Nessa circunstância, é necessário o uso de fármacos capazes de diminuir ou inibir esse evento (SADIK; LUSTER, 2012). As citocinas e/ou o NO são alvos ideais para anti-inflamatórios devido ao seu papel no processo inflamatório (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007).

No presente estudo, a atividade dos extratos de semente de *P. americana* em modular a produção de NO foi avaliada em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulada por LPS. Os dados obtidos demonstram (GRÁFICO 2) que sem estímulo LPS não houve nenhuma alteração na produção de NO por nenhum dos extratos, as alterações somente ocorreram quando as células foram tratadas concomitantemente com extrato e estimuladas com LPS. Os extratos AL.m (1) e AL.v (1) não alteraram a produção NO nos macrófagos ativados, porém o tratamento com os demais suprimiu significativamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) em relação ao controle (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extrato): CWB.v (1) = $3,14 \pm 0,85$ μ M; CWB.m (1) = $3,43 \pm 0,42$ μ M; AL. m (8) = $1,92 \pm 1,71$ μ M, AL.v (8) = $1,26 \pm 1,12$ μ M, CWB.v (8) = $1,30 \pm 1,37$ μ M, CWB.m (8) = $0,77 \pm 0,76$ μ M; AL.m (9) = $2,93 \pm 0,71$ μ M, AL.v (9) = $1,85 \pm 1,36$ μ M, CWB.v (9) = $1,04 \pm 1,18$ μ M, CWB.m (9) = $1,97 \pm 1,98$ μ M.

A atividade anti-inflamatória do extrato de sementes pode estar relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos encontrados bem como das persenonas A e B, procianidinas e catequina que possuem ação sobre a iNOS, a geração e a captação de NO (KIM; MURAKAMI; NAKAMURA; et al., 2000; GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2008; UPADHYAY et al., 2010). A variação na intensidade da ação dos extratos pode estar relacionada aos diferentes fatores de extração aos quais foram submetidos.

GRÁFICO 2 – MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTICO POR MACRÓFAGOS (RAW 264.7)

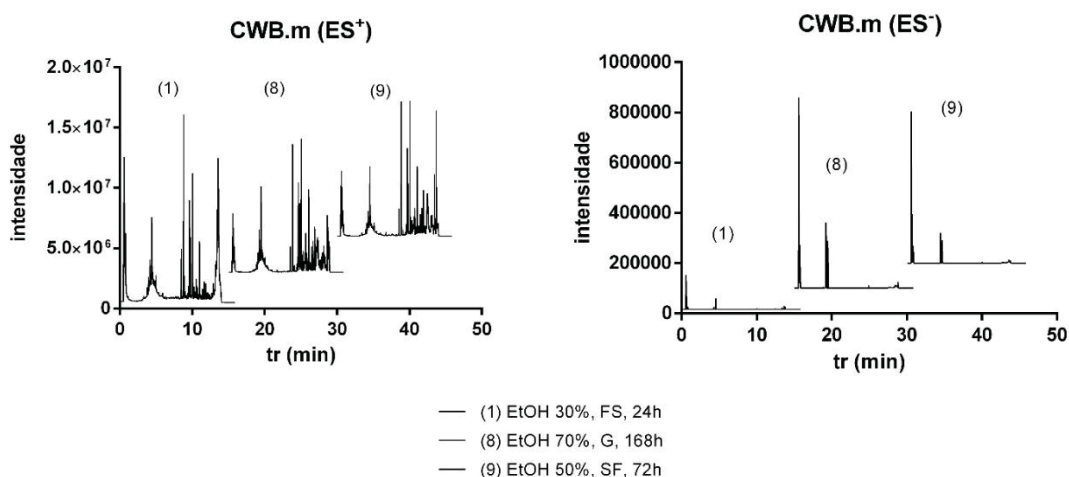


FONTE: A autora (2019).

NOTAS: * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

Observando-se os cromatogramas das amostras CWB.m (FIGURA 39) nas três condições de extração (1, 8 e 9) é possível perceber a diferença entre as amostras da condição (1) comparada as amostras das condições (8) e (9), assim como a similaridade entre as amostras das condições (8) e (9) o que pode justificar as semelhanças e diferenças nas intensidades da atividade sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

FIGURA 39 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UPLC-QTOF-EM, DA AMOSTRA CWB.M NAS TRÊS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO, EM MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO



FONTE: A autora (2019).

4.5.3 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com extratos hidroalcoólicos de sementes de *P. americana*.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, solúveis, produzidas geralmente após ou durante uma resposta do organismo a estímulos endógenos ou exógenos. São raramente detectadas em indivíduos saudáveis, mas atuam na regulação química das respostas imunológicas estando presentes em altas concentrações em indivíduos que apresentam quadros infecciosos, inflamatórios e doenças crônicas (SARROUH et al., 2008; MOTA et al., 2010). As citocinas possuem diversas atribuições biológicas e são produzidas por diversas células, principalmente por linfócitos, monócitos e macrófagos (MOTA et al., 2010). Secretadas por células imunológicas as citocinas desempenham importante papel nas respostas imunes e inflamatórias, sendo as mais conhecidas como pró-inflamatórias IL-1 α e β , IL-8 (KC), TNF e anti-inflamatórias que atuam inibindo as células de defesa produtoras da reação inflamatória ou a produção das citocinas que estimulam a inflamação, e são: IL-10 e a IL-13 (SARROUH et al., 2008).

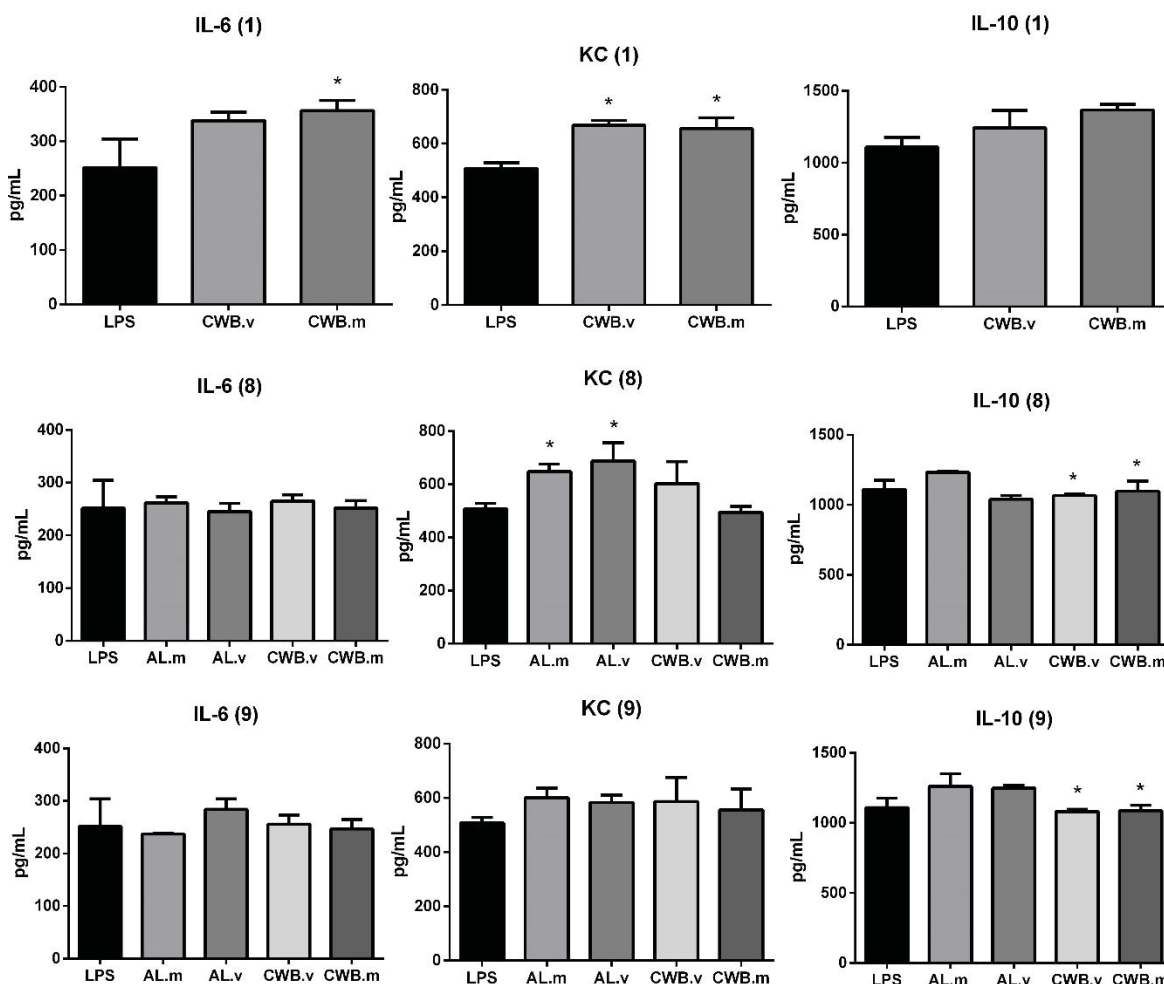
Baseado na inibição da produção de óxido nítrico foram selecionados os extratos CWB.m **(1)**, CWB.v **(1)**, CWB.m **(8)**, CWB.v **(8)**, AL.m **(8)**, AL.v **(8)**, CWB.m **(9)**, CWB.v **(9)**, AL.m **(9)**, e AL.v **(9)** para avaliação da produção das citocinas IL-10, KC (quimiocina derivada de queratinócitos, homóloga da IL-8, que faz quimiotaxia para neutrófilos e são produzidos principalmente pelos macrófagos) e IL-6.

Os extratos não afetaram significativamente a produção de citocinas em relação ao controle (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extrato), o que é uma surpresa visto seu uso tradicional para dores articulares. Entretanto, os extratos apresentaram comportamentos distintos entre si. Os extratos CWB.m **(1)** e CWB.v **(1)** apresentaram efeito pró-inflamatório, estimulando a produção de KC e IL-6, sem efeito na produção de IL-10. Os extratos da condição **(8)** não modularam a produção de IL-6, sendo que o AL.m **(8)** e AL.v **(8)** aumentaram a produção de KC. O extrato AL.m **(8)** aumentou a produção de IL-10 em comparação aos demais extratos do mesmo grupo. Os extratos do grupo **(9)** não modularam a produção de IL-6 e KC, sendo que o AL.m **(9)** aumentou a produção de IL-10 em comparação aos extratos CWB.v **(9)** e CWB.m **(9)** (GRÁFICO 3).

Pode-se sugerir que outros mecanismos estão envolvidos e, no futuro, diferentes ensaios serão avaliados para o estudo dessa atividade. Visto que são várias

as vias de transcrição de citocinas, possivelmente o efeito anti-inflamatório dos extratos pode estar relacionado a outras vias que não foram avaliadas neste estudo.

GRÁFICO 3 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS POR MACRÓFAGOS (RAW 264.7)



FONTE: A autora (2019).

NOTAS: **IL-6**: CWB.m (1) = $p < 0,05$ em relação ao macrófago estimulado com LPS. **KC**: CWB.m (1) e CWB.v (1) = $p < 0,05$ em relação a AL.m(1). AL.m (8) e AL.v (8) = $p < 0,05$ em relação ao macrófago ativado com LPS. CWB.m (8) = $p < 0,05$ em relação a AL.m (8) e CWB.m (8) = $p < 0,05$ em relação a AL.m (8). **IL-10**: AL.v (8) e CWB.v (8) = $p < 0,05$ em relação a AL.m (8) e CWB.v (9) e CWB.m (9) = $p < 0,05$ em relação a AL.m (9).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram obtidos diferentes extratos a partir do planejamento fatorial 2^3 , em que foram variados os fatores de extração: grau alcoólico, granulometria do pó e tempo de extração por maceração. Estes fatores, bem como a maturação das amostras, refletem cientificamente a formulação popular e influenciam diretamente na extração de compostos bioativos de drogas vegetais. A partir da padronização e avaliação destas condições foi possível determinar as condições que apresentam maior efetividade de extração, a partir das ferramentas analíticas utilizadas e das respostas dos extratos sobre os macrófagos, direcionando os próximos passos desta investigação.

A ferramenta analítica CLAE-DAD demonstrou ser uma técnica viável para obtenção do perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das sementes de *P. americana*, mostrando-se uma ferramenta útil para determinação de parâmetros de qualidade.

Através da técnica CLUE-ESI-QToF-EM que se apresentou extremamente eficaz para identificação dos compostos e consequentemente a caracterização química dos extratos das sementes desta espécie, foi possível identificar 46 substâncias do extrato hidroalcoólico sendo uma contribuição à consolidação do perfil químico desta espécie possibilitando a continuação da investigação quanto ao seu uso popular em doenças articulares.

A extração dos constituintes químicos das amostras por álcool etílico 50% (v/v) e 70% (v/v) demonstraram não apresentar diferença significativa, tendo em vista os perfis cromatográficos obtidos por CLUE-ESI-QToF-EM que apresentaram número de picos e intensidades semelhantes, as amostras terem se agrupado no mesmo quadrante na análise de componentes principais, e estes extratos terem apresentado atividade semelhante sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Além disso, pelos gráficos de escores é possível perceber que a granulometria e o tempo de extração não foram significativamente influentes para distinção das amostras, o que pode ser justificado pela técnica de extração. A maceração estática permite a sedimentação da amostra impedindo o contato do solvente com todas as partículas independentemente de seus tamanhos, sendo assim apenas o grau alcoólico do solvente foi significativo para distinguir a composição química do extrato bem como sua atividade sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos.

Tendo em vista que os extratos apresentaram atividades de intensidades diferentes sobre a viabilidade celular, bem como na produção de óxido nítrico e de citocinas, pode-se afirmar que variação nos fatores de extração afetam a responsividade desses extratos sobre os macrófagos que são os principais atores da inflamação. Levando em consideração que os extratos modularam consideravelmente a produção de óxido nítrico, ainda que não influenciaram positivamente a produção das citocinas investigadas, é necessário continuar a investigação de outras vias da inflamação a fim de identificar seu mecanismo de ação no uso popular.

A identificação de substâncias que possuem atividades biológicas previamente relatadas na literatura, a atividade sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, bem como o medicamento disponível no mercado produzido a partir de *P. americana* e utilizado para osteoartrite, demonstram a importância deste trabalho. Visto que as sementes são atualmente consideradas sub-produtos da espécie e são normalmente descartadas, demonstrar seu potencial biológico trará maior benefício para as indústrias farmacêuticas que utilizam o abacate na produção de medicamentos, bem como reduzirá a produção de resíduos, de forma que podem ser uma fonte de compostos potencialmente bioativos.

Por todas essas razões, estimula-se estabelecer uma exploração racional e sustentável da grande biodiversidade brasileira, auxiliar no tratamento de comorbidades prevalentes na população e também atender às necessidades das empresas farmacêuticas desses países.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista o potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de sementes de *P. americana* Mill. relatado popularmente e brevemente investigado por este trabalho, incentiva-se a continuidade desta investigação, visto que há muitos sinais espectrométricos que ainda precisam ser identificados, diversas vias inflamatórias em que o extrato pode atuar bem como técnicas de extração que podem ser avaliadas.

Os estudos quimiométricos realizados direcionam para as melhores condições de tempo de maceração e grau alcoólico para a maior efetividade de extração de compostos bioativos, porém ainda podem ser avaliadas técnicas de extração visando otimização para produção de um fitoterápico tópico, bem como necessita-se validar os métodos analíticos utilizados.

A alta prevalência de doenças articulares crônicas estimula a produção de um novo medicamento fitoterápico tópico a fim de atuar como coadjuvante na terapia medicamentosa para pacientes cujas comorbidades não permitem o uso de antiinflamatórios por via oral.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AKAHANE, H.; OGURA, T.; MARTINEZ-ALFARO, M. A.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1314-7, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15997123>.
- ADEBOYE, J. O.; FAJONYOMI, M. O.; MAKINDE, J. M.; TAIWO, O. B. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 15-20, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X9800015X>.
- ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OGUNTI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 375-80, Aug 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165331>.
- ADIKARAM, N. K. B.; EWING, D. F.; KARUNARATNE, A. M.; WIJERATNE, E. M. K. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 93-96, 1992. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183013B>.
- AHMED, N.; SMITH, R. W.; HENAO, J. J. A.; STARK, K. D.; SPAGNUOLO, P. A. Analytical Method To Detect and Quantify Avocatin B in Hass Avocado Seed and Pulp Matter. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 818-824, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00914>.
- ALMEIDA, A. P.; MIRANDA, M. M. F. S.; SIMONI, I. C.; WIGG, M. D.; LAGROTA, M. H. C.; COSTA, S. S. Flavonol Monoglycosides Isolated from the antiviral Fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 8, p. 562-567, 1998.
- ALMEIDA, G. V. B. **O abacate no mundo, no brasil e na CEAGESP de São Paulo**. 2018. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2018/08/ABACATE-4.pdf>.
- ANAKA, O. N.; OZOLUA, R. I.; OKPO, S. O. Effects of Aqueous Seed Extract of *Persea americana* Mill on the blood pressure of sprague-dawley rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 10, p. 485-490, 2009. Disponível em: <https://www.iuokada.edu.ng/publications/Anaka%20et%20al.pdf>.
- ANTIA, B. B.; OKOKON, J. E.; OKON, P. A. Hypoclicemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* Mill. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 37, n. 5: 325-326 p. 2005.
- ANUSAK, S.; THITIMA, C.; ITHARAT, A. Development of the chromatographic fingerprint analysis of dioscorealides and dioscoreanone from *Dioscorea membranacea* Pierre. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29,

Suppl. 1, p.101-107, 2007 Disponível em: http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/29-Suppl-1/11Anusak_101-107.pdf.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. v1 e v2, 2010.

AU, R. Y.; AL-TALIB, T. K.; AU, A. Y.; PHAN, P. V.; FRONDOZA, C. G. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 11, p. 1249-55, Nov 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17845860>.

AYSUN, A.; YAĞMUR, K.; YUSUF, B. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/node/144610/article>.

BASHIR, S.; SHARMA, Y.; ELAHI, A.; KHAN, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 1-11, Jan 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26467935>.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n.10 p. 907-916. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**, v. 36, n. 3, p. 161-78, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687683>.

BONDESON, J.; WAINWRIGHT, S. D.; LAUDER, S.; AMOS, N.; HUGHES, C. E. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. 6, p. R187, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17177994>.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Série B. Textos básicos de Saúde, 2006. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo-Patologia**. 8. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n.2, p. 179-189, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2000000200004&nrm=iso.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n.1-2, p. 131-134, 2005.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003612>

CAMERON, M.; CHRUBASIK, S. Topical herbal therapies for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 5, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728701>.

_____. Oral herbal therapies for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 5, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848732>.

CASTILLO-JUAREZ, I.; GONZALEZ, V.; JAIME-AGUILAR, H.; MARTINEZ, G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 402-5, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162157>.

CASTRO-LÓPEZ, C.; BAUTISTA-HERNÁNDEZ, I.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G.; ROJAS, R.; GUTIÉRREZ-DÍEZ, A.; MEDINA-HERRERA, N.; AGUIRRE-ARZOLA, V. E. Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaf Purified Hydroalcoholic Extracts from Seven Mexican *Persea americana* Cultivars. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 1, p. 173, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30621198>

CHRUBASIK, J. E.; ROUFOGALIS, B. D.; CHRUBASIK, S. Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 7, p. 675-83, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17444576>.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-11, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12720369>.

COIMBRA, I.; PASTOR, E.; GREVE, J.; PUCCINELLI, M.; FULLER, R.; CAVALCANTI, F.; MACIEL, F.; HONDA, E. Osteoartrite (artrose): tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, p. 450-453, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042004000600009&nrm=iso.

CONAB. **Boletim Hortigranjeiro**. v.4, n.8, Brasília. 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>

CONTRERAS-GUTIERREZ, P.K.; HURTADO-FERNANDEZ, E; GOMEZ-ROMERO, M.; HORMAZA, J. I.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Determination of changes in the metabolic profile of avocado fruits (*Persea americana*) by two CE-MS approaches (targeted and non-targeted). **Electrophoresis**, n. 1522-2683 (Electronic), 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.201200676>

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np9604893>.

CRUVINEL, W. d. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. d.; SILVA, N. P. d.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4 p. 434-4461, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&nrm=iso.

DAGHESTANI, H. N.; PIEPER, C. F.; KRAUS, V. B. Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 67, n. 4, p. 956-65, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25544994>.

DAILEY, A.; VUONG, Q. V. Effect of extraction solvents on recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p.1-10, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1080/23311932.2015.1115646>.

DAIUTO, É. R.; TREMOCOLDI, M. A.; ALENCAR, S. M. d.; VIEITES, R. L.; MINARELLI, P. H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000200018&nrm=iso.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986-95, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.2705>.

DE SMET, P. A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-40, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421691>.

DEAL, C. L.; SCHNITZER, T. J.; LIPSTEIN, E.; SEIBOLD, J. R.; STEVENS, R. M.; LEVY, M. D.; ALBERT, D.; RENOLD, F. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. **Clinical Therapeutics**, v. 13, n. 3, p. 383-95, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1954640>.

DEL REFUGIO RAMOS, M.; JERZ, G.; VILLANUEVA, S.; LOPEZ-DELLAMARY, F.; WAIBEL, R.; WINTERHALTER, P. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 955-62, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081301>.

DI STEFANO, V.; AVELLONE, G.; BONGIORNO, D.; INDELICATO, S.; MASSENTI, R.; LO BIANCO, R. Quantitative evaluation of the phenolic profile in fruits of six avocado (*Persea americana*) cultivars by ultra-high-performance liquid

chromatography-heated electrospray-mass spectrometry. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 6, p. 1302-1312, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1208225>.

DING, H.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D.; D'AMBROSIO, S. M. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 5, p. 386-94, Oct 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582784>.

DING, H.; HAN, C.; GUO, D.; CHIN, Y. W.; DING, Y.; KINGHORN, A. D.; D'AMBROSIO, S. M. Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 3, p. 348-56, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373608>.

DOMERGUE, F.; HELMS, G. L.; PRUSKY, D.; BROWSE, J. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. **Phytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 183-189, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200000558>.

DOMÍNGUEZ, M.; AVILA, J. G.; NIETO, A.; CÉSPEDES, C. L. Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 2, p. 118-124, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.503708>.

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação: Aspectos técnicos da produção**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183134/1/FrupeX-Abacate-para-Exportacao-Aspectos-Tecnicos-da-Producao-2-Ed-1995.pdf>.

DRAYTON, D. L.; LIAO, S.; MOUNZER, R. H.; RUDDLE, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nature Immunology**, v. 7, n. 4, p. 344-53, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni1330>.

DUNSTER, J. L. The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 87-99, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459225>.

EDEM, D.; EKANEM, I.; EBONG, P. Effect of aqueous extracts of alligator pear seed (*Persea americana* Mill) on blood glucose and histopathology of pancreas in alloxan-induced diabetic rats. **Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 272-6, 2009. Disponível em: http://applications.emro.who.int/imemrf/pak_j_pharm_sci/pak_j_pharm_sci_2009_22_3_272_276.pdf.

ERNST, E. Avocado-soybean unsaponifiables (ASU) for osteoarthritis - a systematic review. **Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 4-5, p. 285-8, Oct 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576991>.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3579-3585, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0201327>.

FERNANDEZ, E. H.; PANCORBO, A. C.; GUTIERREZ, A. F. Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2255-67, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332177>.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria- Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP. Unicamp, 2015, 493p.

FIGUEROA, J. G.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 105, p. 752-763, 2018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917308529>.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets. Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-6, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101534>.

GAD, H. A.; EL-AHMADY SH FAU - ABOU-SHOER, M. I.; ABOU-SHOER MI FAU - AL-AZIZI, M. M.; AL-AZIZI, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. **Phytochemical Analysis**, v.24, n.1, p.1-24, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678654>.

GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis-An update covering 2011-2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 211-233, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28823765>.

GEMPERLINE, P. Principal Component Analysis. In: **Practical Guide To Chemometrics**. 2. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006, p.69-104.

GIRI, L.; ANDOLA, H.; KANT PUROHIT, V.; RAWAT, M. S. M.; RAWAL, R.; BHATT, I. Chromatographic and Spectral Fingerprinting Standardization of Traditional Medicines: An Overview as Modern Tools. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 4, n. 4, p. 234-241, 2010. Disponível em: <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=rjphyto.2010.234.241>.

GLYN-JONES, S.; PALMER, A. J.; AGRICOLA, R.; PRICE, A. J.; VINCENT, T. L.; WEINANS, H.; CARR, A. J. Osteoarthritis. **Lancet**, v. 386, n. 9991, p. 376-87, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25748615>.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundarios. **Quimica Nova**, v. 30, N. 2,p.374-381, 2007. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1911.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells. **Immunity**, v. 10, n. 2, p. 137-142, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130080014X>.

GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. D. Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 331-362, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408390903584094>.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **European Journal of Immunology**, v. 37, Suppl. 1, p. S9-17, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972350>.

GOUDARZI, R.; TAYLOR, J. F.; YAZDI, P. G.; PEDERSEN, B. A. Effects of Arthrocan, an avocado/soy unsaponifiables agent, on inflammatory mediators and gene expression in human chondrocytes. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 2, p. 187-194, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174685>.

GRACE, D.; ROGERS, J.; SKEITH, K.; ANDERSON, K. Topical diclofenac versus placebo: a double blind, randomized clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee. **The Journal of Rheumatology**, v. 26, n. 12, p. 2659-63, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606379>.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. Belo Horizonte: Adequatio Estudio, 2014. 1204p.

GREENE, M. A.; LOESER, R. F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1966-71, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26521742>.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cber.187901201117>.

GRUBE, B.; GRUNWALD, J.; KRUG, L.; STAIGER, C. Efficacy of a comfrey root (*Symphyti offic. radix*) extract ointment in the treatment of patients with painful osteoarthritis of the knee: results of a double-blind, randomised, bicenter, placebo-controlled trial. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 2-10, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169543>.

GUEVARRA, A. P.; ESPINO, M. A. P.; CHUA, C.; RUSSEL, G. Anti-inflammatory principles of the leaves of *Persea americana* Mill.. **The Philippine Journal of Science**, v. 127, n. 2, p. 81-91, 1998. Disponível em: http://philjournalsci.dost.gov.ph/images/pdf_upload/pjs1998/PJS_Vol._127_No._2_A pr-Jun_1998.pdf.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. (+)-Catechin inhibits tumour angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF-alpha in LPS-stimulated

macrophages. **Innate Immunity**, v. 14, n. 3, p. 160-74, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562575>.

HASHIMURA, H.; UEDA, C.; KAWABATA, J.; KASAI, T. Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill) fruits. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n. 7, p. 1656-8, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515553>.

HASSAN, B. HPLC Uses and Importance in the Pharmaceutical Analysis and Industrial Field. **Pharmaceutica Analytica Acta**. v.3, n.9, 2012. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/hplc-uses-and-importance-in-the-pharmaceutical-analysis-and-industrial-field-2153-2435.1000e133.php?aid=9699>.

HENROTIN, Y.; LAMBERT, C.; COUCHOUREL, D.; RIPOLL, C.; CHIOTELLI, E. Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19, n. 1, p. 1-21, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035558>.

HO, C. S.; LAM, C. W.; CHAN, M. H.; CHEUNG, R. C.; LAW, L. K.; LIT, L. C.; NG, K. F.; SUEN, M. W.; TAI, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemistry Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3-12, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>.

HOCHBERG, M. C.; ALTMAN, R. D.; APRIL, K. T.; BENKHALTI, M.; GUYATT, G.; MCGOWAN, J.; TOWHEED, T.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 4, p. 465-474, 2012. Disponível em: http://mqic.org/pdf/2012_ACR_OA_Guidelines_FINAL.PDF.

HONG, J. Y.; CHUNG, K.-S.; SHIN, J.-S.; PARK, G.; JANG, Y. P.; LEE, K.-T. Anti-Colitic Effects of Ethanol Extract of *Persea americana* Mill. through Suppression of Pro-Inflammatory Mediators via NF- κ B/STAT3 Inactivation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 177, 2019. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/1/177>.

JESUS, D.; OLIVEIRA, J. R.; OLIVEIRA, F. E.; HIGA, K. C.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; BACK-BRITO, G. N.; OLIVEIRA, L. D. *Persea americana* Glycolic Extract: In Vitro Study of Antimicrobial Activity against *Candida albicans* Biofilm and Cytotoxicity Evaluation. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-5, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/531972>.

KASHMAN, Y.; NEEMAN, I.; LIFSHITZ, A. New compounds from avocado pear. **Tetrahedron**, v. 25, p. 4617-4631, 1969.

KATE, E. I.; AMAECHINA, F. C. Effects of Aqueous Seed Extract of *Persea americana* Mill. (Avocado) on Blood Pressure and Lipid Profile in Hypertensive Rats. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 2, p. 116-121, 2010.

KATE, E. I.; LUCKY, O. O. Biochemical evaluation of the tradomedicinal uses of the seeds of *Persea americana* Mill.. **World Journal of Medicinal Sciences**, v. 4, n. 2, p. 143-146, 2009.

KAWAGISHI, H.; FUKUMOTO, Y.; HATAKEYAMA, M.; HE, P.; ARIMOTO, H.; MATSUZAWA, Y.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; SUGIYAMA, K. Liver injury suppressin compouds from avocado (*Persea americana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2215-2221, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368579>.

KHARYUK, P.; NAZARENKO, D.; OSELEDETS, I.; RODIN, I.; SHPIGUN, O.; TSITSILIN, A.; LAVRENTYEV, M. Employing fingerprinting of medicinal plants by means of LC-MS and machine learning for species identification task. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17053, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35399-z>.

KIM, O. K.; MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, N.; YOSHIZUMI, H.; OHIGASHI, H. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 48, p. 1557-1563, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820058>.

KIM, O. K.; MURAKAMI, A.; TAKAHASHI, D.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; KIM, H. W.; OHIGASHI, H. An avocado constituent, persenone A, suppresses expression of inducible forms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in macrophages, and hydrogen peroxide generation in mouse skin. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 64, n. 11, p. 2504-7, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193428>.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical reviews**, v. 2, n. 1-4, p. 23-60, 2010. Disponível em: [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3015162/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3015162/)

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. e23, p. 1-12, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740602>.

KOPARDE, A. A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural Products in Drug Discovery. **IntechOpen**, 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/natural-products-in-drug-discovery>.

KOSIŃSKA, A.; KARAMAĆ, M.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; BARTOLOMÉ, B.; DYKES, G. A. Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4613-4619, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494370>.

KRAUS, V. B.; MCDANIEL, G.; HUEBNER, J. L.; STABLER, T. V.; PIEPER, C. F.; SHIPES, S. W.; PETRY, N. A.; LOW, P. S.; SHEN, J.; MCNEARNEY, T. A.; MITCHELL, P. Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 24, n. 9, p.1613-21, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084348>.

KUMAR, B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 6, p. 349-364, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404060>.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbin e Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458.

KUPIEC, T. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.8, n.3, p. 223-227, 2004. Disponível em: https://www.arlok.com/sites/default/files/2018-03/High-Performance%20Liquid%20Chromatography_0.pdf

LARIA, A.; LURATI, A.; MARRAZZA, M.; MAZZOCCHI, D.; RE, K. A.; SCARPELLINI, M. The macrophages in rheumatic diseases. **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755472/>

LAZAROWYCH, N. J.; PEKOS, P. Use of Fingerprinting and Marker Compounds for Identification and Standardization of Botanical Drugs: Strategies for Applying Pharmaceutical HPLC Analysis to Herbal Products. **Drug Information Journal**, v. 32, n. 2, p. 497-512, 1998. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/009286159803200222>.

LEBRE, M.; TAK, P. P. Macrophage Subsets in Immune-Mediated Inflammatory Disease: Lessons from Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthritis, Osteoarthritis, Behçet's Disease and Gout. **The Open Arthritis Journal**, n. 3, p. 18-23, 2010. Disponível em: <https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOARTHJ-3-18>.

LEE, S.-G.; YU, M.-H.; LEE, S.-P.; LEE, I.-S. Antioxidant Activities and Induction of Apoptosis by Methanol Extracts from Avocado. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 269-275, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/250273055_Antioxidant_Activities_and_Induction_of_Apoptosis_by_Methanol_Extracts_from_Avocado.

LEITE, J. J.; BRITO, E. H.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; SIDRIM, J. J.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; ROCHA, M. F. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 110-3, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000200003.

LEOPOLDINI, M.; MARINO, T.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 22, p. 4916-4922, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp037247d>

LIN, L. Z.; SUN, J.; CHEN, P.; MONAGAS, M. J.; HARNLY, J. M. UHPLC-PDA-ESI/HRMSn profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in

plant products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9387-400, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25032782>

LIU, L.; ZHANG, J.; ZHENG, B.; GUAN, Y.; WANG, L.; CHEN, L.; CAI, W. Rapid characterization of chlorogenic acids in *Duhaldea nervosa* based on ultra-high-performance liquid chromatography-linear trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry and mass spectral trees similarity filter technique. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 8, p. 1764-1774, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29327507>

LIU, X.; ROBINSON, P. W.; MADORE, M. A.; WITNEY, G. W.; APAIA, M. L. 'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. II. Fruit growth and ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 676-681, 1999. Disponível em: http://www.avocadosource.com/journals/ashs/ASHS_1999_124_6_PG_676-681.pdf

LÓPEZ-COBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; PASINI, F.; CABONI, M. F.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. **LWT**, v. 73, p. 505-513, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816303814>.

LU, Y.-C.; CHANG, H.-S.; PENG, C.-F.; LIN, C.-H.; CHEN, I.-S. Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2904-2909, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980888>.

LV, Q.; LUO, F.; ZHAO, X.; LIU, Y.; HU, G.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980888>.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5956

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176-85, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23096265>

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage Polarization Comes of Age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344-346, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226499>

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677-86, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>.

MARCH, R. E.; MIAO, X.-S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2-3, p. 157-167, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138738060300455X>

MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. J.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares: Description, Operation and Applications. **Química Nova**, v.37, n.9, p.1525-1532, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000900017

MARTINS, L. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of Phyllanthus aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 2, p. 469-81, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336795>

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913>.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.; MELLO, J.C.P, MENTZ, L. A; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MOBASHERI, A.; MATTA, C.; ZAKANY, R.; MUSUMECI, G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 237-44, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637957>.

MOORE, R. A.; TRAMER, M. R.; CARROLL, D.; WIFFEN, P. J.; MCQUAY, H. J. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Bmj**, v. 316, n. 7128, p. 333-8, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487165>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>

MOTA, L. M. H. d.; SANTOS NETO, L. L. d.; BURLINGAME, R.; MÉNARD, H. A.; LAURINDO, I. M. M. Características laboratoriais de um grupo de pacientes com artrite reumatoide inicial. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 375-380, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0482-50042010000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

MOURA MDEL, G.; LOPES, L. C.; BIAVATTI, M. W.; BUSSE, J. W.; WANG, L.; KENNEDY, S. A.; BHATNAGA, N.; BERGAMASCHI CDE, C. Brazilian oral herbal medication for osteoarthritis: a systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v. 5, p. 86, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27209428>

MOY, L. S. **Cosmetic formulation and method for amelioration of skin keratoses and striae distensae**: Google Patents 1998. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/5759555.html>

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 541-566, 2017. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>.

NAGARAJ, M.; SANDHYA, V.; SUPIYA, G.; MANJU, R.; KUMARI, P.; BOLE, S.; LALITHA, V.; KIRAN, B. Antioxidant and antibacterial activity of Avocado (*Persea gratissima* Gaertnes) seed extract. **World Applied Sciences Journal**, v. 9, n. 6, p. 695-698, 2010. Disponível em: [https://www.idosi.org/wasj/wasj9\(6\)2010.htm](https://www.idosi.org/wasj/wasj9(6)2010.htm).

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01320>

_____. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-82, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498448>

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. Cianidanol, CID=9064. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9064>.

NAWAZ, H.; POHORLY, J.; MITTAL, G.; KAKUDA, Y.; JIANG, Y. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods—Engineering and Technology AU - Shi, John. **Food Reviews International**, v. 21, n. 1, p. 139-166, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/FRI-200040606>.

NAYAK, B. S.; RAJU, S. S.; CHALAPATHI RAO, A. V. Wound healing activity of *Persea americana* (avocado) fruit: a preclinical study on rats. **Journal of Wound Care**, v. 17, n. 3, p. 123-6, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376654>

NEMES, A.; SZÖLLŐSI, E.; STÜNDL, L.; BIRÓ, A.; HOMOKI, J. R.; SZARVAS, M. M.; BALOGH, P.; CZIÁKY, Z.; REMENYIK, J. Determination of Flavonoid and Proanthocyanidin Profile of Hungarian Sour Cherry. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3278, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321385/>

NIKAM, P. H.; KAREPARAMBAN, J.; JADHAV, A.; KADAM, V. Future trends in standardization of herbal drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, n.6, p.38-44, 2012. Disponível em: https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/499_pdf.pdf.

NWAOGUIKPE, R. N.; BRAIDE, W. <The-effect-of-aqueous-seed-extract-of-persea-americana-avocado-pear-on-serum-lipid-and-cholesterol-levels-in-rabbits.pdf>. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology Research**, v. 1, n. 2, p. pp. 023-029, 2011.

OBERLIES, N. H.; ROGERS, L. L.; MARTIN, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. **Journal of**

Natural Products, v. 61, n. 6, p. 781-5, 1998. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9644064>

ODUBANJO, V.; OBOH, G.; MAKINDE, A. Inhibitory Effect of Aqueous Extracts of Avocado Pear (*Persea americana*) Leaf and Seed on Angiotensin 1- Converting Enzyme: A Possible Means in Treating/Managing Hypertension. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2016. Disponível em:
http://www.journalrepository.org/media/journals/JALSI_40/2015/Oct/Odubanjo412015JALSI21605.pdf

OJEWOLE, J. A.; AMABEOKU, G. J. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 8, p. 696-700, 2006. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775810>

OWNBY, S. L.; FORTUNO, L. V.; AU, A. Y.; GRZANNA, M. W.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; FRONDOZA, C. G. Expression of pro-inflammatory mediators is inhibited by an avocado/soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate combination. **Journal of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 8, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678847>

OWOLABI, M. A.; JAJA, S. I.; COKER, H. A. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 567-73, 2005. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990249>

OZOLUA, R. I.; ANAKA, O. N.; OKPO, S. O.; IDOGUN, S. E. Acute and sub-acute toxicological assessment of the aqueous seed extract of *Persea americana* Mill (Lauraceae) in rats. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 573-8, 2009. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2816474/>.

PADILLA-CAMBEROS, E.; MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; VILLANUEVA-RODRIGUEZ, S. Acute toxicity and genotoxic activity of avocado seed extract (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). **Scientific World Journal**, v. 2013, 4p., 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/245828/>.

PAHUA-RAMOS, M. E.; ORTIZ-MORENO, A.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; HERNANDEZ-NAVARRO, M. D.; GARDUNO-SICILIANO, L.; NECOECHEA-MONDRAGON, H.; HERNANDEZ-ORTEGA, M. Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 67, n. 1, p. 10-6, 2012. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383066>

PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food and Function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776454>

PATEL, R. K.; PATEL, V. R.; PATEL, M. G. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of Embelin, Rottlerin and Ellagic

acid in *Vidangadi churna*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 366-371, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29403768>

PATEL, U.; RAJASINGH, S.; SAMANTA, S.; CAO, T.; DAWN, B.; RAJASINGH, J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 1, p. 186-193, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644616302938>.

POOVARODOM, S.; HARUENKIT, R.; VEARASILP, S.; NAMIEŚNIK, J.; CVIKROVÁ, M.; MARTINCOVÁ, O.; EZRA, A.; SUHAJ, M.; RUAMSUKE, P.; GORINSTEIN, S. Comparative characterisation of durian, mango and avocado. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.921-929, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02227.x>

PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A. H.; MOLON, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World journal of experimental medicine**, v. 5, n. 2, p. 64-76, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992321>

RAMOS-JERZ, R. M.; VILLANUEVA, S.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P.; DETERS, A. M. *Persea americana* Mill. Seed: Fractionation, Characterization, and Effects on Human Keratinocytes and Fibroblasts. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 12p., 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24371457>

RAMOS, M. E. P.; MORENO, A. O.; CEVALLOS, G. C.; NAVARRO, M. D. H.; SICILIANO, L. G.; MONDRAGÓN, H. N.; ORTEGA, M. H. Hypolipidemic Effect of Avocado (*Persea americana* Mill) Seed in a Hypercholesterolemic Mouse Model. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 10-16, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383066>

RAYMOND CHIA, T. W.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 7, p. 753-6, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645772>

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584995022279>.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

RODRIGUEZ-CARPENA, J. G.; MORCUENDE, D.; ANDRADE, M. J.; KYLLI, P.; ESTEVEZ, M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 10, p. 5625-35, 2011.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480593>

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, C. E.; HERNÁNDEZ-BRENES, C.; DÍAZ DE LA GARZA, R. I. A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). **RSC Advances**, v. 5, n. 128, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA22854A>.

ROGE, A. B.; FIRKE, S.; DHANE, R. M.; GUNJKAR, V. J.; VADVALKAR, S. M. Novel achievement of HPLC: UPLC. **Journal of AOAC International**, v.3, n.3, p.1423-1429, 2011. Disponível em: [http://www.sphinxesai.com/Vol.3No.3/pharm/pdf/PT=32\(1423-1429\)JS11.pdf](http://www.sphinxesai.com/Vol.3No.3/pharm/pdf/PT=32(1423-1429)JS11.pdf)

ROSENBLAT, G.; MERETSKI, S.; SEGAL, J.; TARSHIS, M.; SCHROEDER, A.; ZANIN-ZHOOROV, A.; LION, G.; INGBER, A.; HOCHBERG, M. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 4, p. 239-46, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20978772>.

ROSS, I. A. **Medicinal Plants of the World**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999.

RUSH, M. D.; RUE, E. A.; WONG, A.; KOWALSKI, P.; GLINSKI, J. A.; VAN BREEMEN, R. B. Rapid Determination of Procyanidins Using MALDI-ToF/ToF Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11355-11361, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30286291>

SADIK, C. D.; LUSTER, A. D. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 91, n. 2, p. 207-215, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058421>

SALAZAR, C. S.; BRENES, C. H.; SANCHEZ, D. G. R.; CASTILLO, E. C.; SILVA, J. M. N.; PACHECO, A. Inhibitory Activity of Avocado Seed Fatty Acid Derivatives (Acetogenins) Against *Listeria Monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 1, p. 134-144, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27871119>

SANCHEZ, D. G. R.; PACHECO, A.; CRUZ, M. I. G.; URIBE, J. A. G.; LOZANO, J. A. B.; BRENES, C. H. Isolation and structure elucidation of avocado seed (*Persea americana*) lipid derivatives that inhibit *Clostridium sporogenes* endospore germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7403-11, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829335>

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As determined by HPLC-DAD-ESI-MS(n). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4681-92, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334341>

SAONA, C. R.; MILLAR, J. G.; MAYNARD, D. F.; TRUMBLE, J. T. Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 5, pp 867–889, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022325601724>

SAONA, C. R.; MILLAR, J. G.; TRUMBLE, J. T. Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1168-1170, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748393>

SARROUH, B. F.; RIVALDI, J., D.; GAMBARATO, B.; SANTOS, D.; DA SILVA, S. Importância das citoquinas no sistema imunológico: propriedades e características funcionais. **Revista Analytica**, n. 32 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/258900113_Importancia_das_citoquinas_no_sistema_imunologico_propriedades_e_caracteristicas_funcionais

SARZI-PUTTINI, P.; CIMMINO, M. A.; SCARPA, R.; CAPORALI, R.; PARAZZINI, F.; ZANINELLI, A.; ATZENI, F.; CANESI, B. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 1 Suppl 1, p. 1-10, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084227>

SCOPARO, C. T.; DE SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Analysis of Camellia sinensis green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion x reversed phase). **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 29-37, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22204932>

SEDA, H.; SEDA, A. C. Osteoartrite. In: MOREIRA, C., CARVALHO, M.A.P. **Reumatologia - diagnóstico e tratamento**, 2.ed, Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p.287-307.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-7, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369558>

SHAHIDI, F.; YEO, J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 6, 16p., 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032343/>

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S. A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29319160>

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252-9, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236016>.

SHEHATA, M. M. S. M.; SOLTAN, S. S. A. Effects of bioactive component of kiwi fruit and avocado (fruit and seed) on hypercholesterolemic rats. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 8, n. 1, p. 82-93, 2013. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/61e9/1740c6c9f526ef27f34531a94d3ad9519058.pdf>

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-71, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722499>

SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111-26, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210152>

SILVA, L. R.; MARTINS, L. V.; CALOU, I. B. F.; MEIRELES DE DEUS, M. S.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonoides constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-37432015000100004

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744097017>.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604001293>

STALIKAS, C. D. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 610, p. 65-90, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013173>

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 744-57, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510006588>

SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 9-12, p. 1130-1150, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de Fitoterapia**. 3ed. Curitiba: Herbarium, 1997. 317p.

TORRES, A. M.; MAU-LASTOVICKA, T.; REZAAIYAN, R. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 921-925, 1987. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00078a018>.

TREMOCOLDI, M. A.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; DAIUTO, E. R.; PASCHOAL, J. A. R.; MELO, P. S.; ALENCAR, S. M. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. **PLoS One**, v. 13, n. 2, 12p., 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444125>.

UPADHYAY, A. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A.; MISHRA, H. S. *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. f. and Thoms. (Guduchi) - validation of the Ayurvedic pharmacology through experimental and clinical studies. **International Journal of Ayurveda Research**, v. 1, n. 2, p. 112-21, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814526>

USHIO, A.; ARAKAKI, R.; YAMADA, A.; SAITO, M.; TSUNEMATSU, T.; KUDO, Y.; ISHIMARU, N. Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. **World Journal of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/2219-2824/full/v7/i1/1.htm>

WANG, A.; LEONG, D. J.; CARDOSO, L.; SUN, H. B. Nutraceuticals and osteoarthritis pain. **Pharmacology and Therapeutics**, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29481810>

WANG, P.; LI, L.; YANG, H.; CHENG, S.; ZENG, Y.; NIE, L.; ZANG, H. Chromatographic fingerprinting and quantitative analysis for the quality evaluation of Xinkeshu tablet. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 6, p. 422-430, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177912000706>.

WANG, W.; BOSTIC, T. R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1193-1198, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610004127>

WANG, W.; CHEN, R.; WANG, J. Procyanidin B2 ameliorates carrageenan-induced chronic nonbacterial prostatitis in rats via anti-inflammatory and activation of the Nrf2 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 794-799, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28844677>

WERMAN, M. J.; MOKADY, S.; NEEMAN, I. Partial isolation and characterization of a new natural inhibitor of lysyl oxidase from avocado seed oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 2164-2168, 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00102a013>

WICZLING, P.; KUBIK, Ł.; KALISZAN, R. pH Effects on Chromatographic Retention Modes. In: **Analytical Separation Science**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. v.1, p.263-277, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep013>.

WIGG, M. D.; AL-JABRI, A. A.; COSTA, S. S.; RACE, E.; BODO, B.; OXFORD, J. S. In-Vitro Virucidal and Virustatic anti HIV-1 Effects of Extracts from *Persea americana* Mill, (Avocado) Leaves. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 7, n. 4, p. 179-183, 1996. Disponível em:

<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/095632029600700401>.

WU, H.; GUO, J.; CHEN, S.; LIU, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 267-291, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708512004931>.

XIONG, H.; YU, L. X.; QU, H. A weighting approach for chromatographic fingerprinting to ensure the quality consistency of botanical drug products. **Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 476-481, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY41728J>.

ZHANG, W.; NUKI, G.; MOSKOWITZ, R. W.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N. K.; BIERMA-ZEINSTRA, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 476-499, 2010a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.013>.

_____. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 476-99, 2010b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170770>.

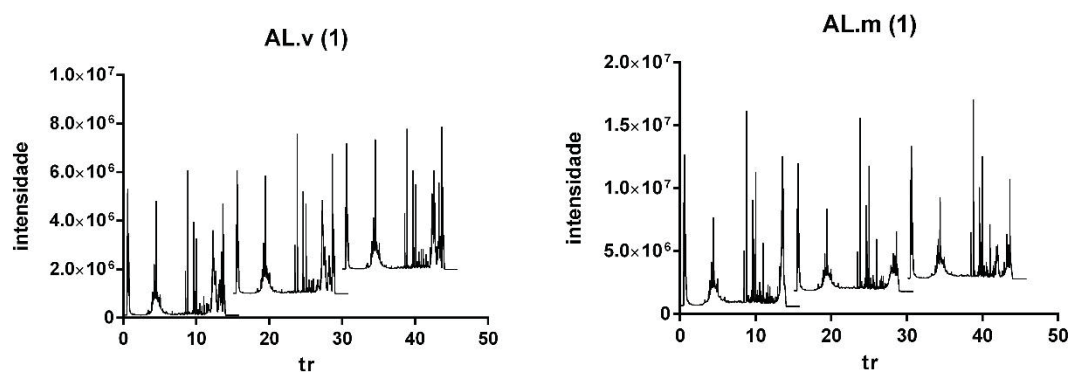
ZHANG, Y.; SHUJUN, S.; DAI, J.; WENYU, W.; HUIJUAN, C.; JIANBING, W.; XIAOJUN, G. Quality Control Method for Herbal Medicine - **Chemical Fingerprint Analysis**, 2011. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b4d4/cc6a2157c106d6ee4f9c5c1e68161ba0b66a.pdf>

ZUVELA, P.; SKOCZYLAS, M.; JAY LIU, J. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, p. 3674-3729, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.8b00246>

YASIR, M.; DAS, S.; KHARYA, M. D. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 7, p. 77-84, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228945>

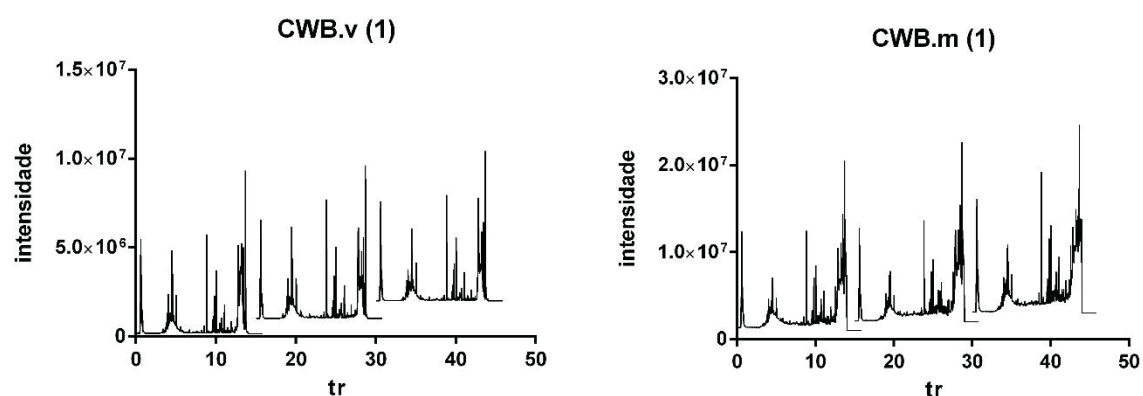
APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMAS

FIGURA 40 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA AL.V.1 e AL.M.1, EM TRIPLICATA.



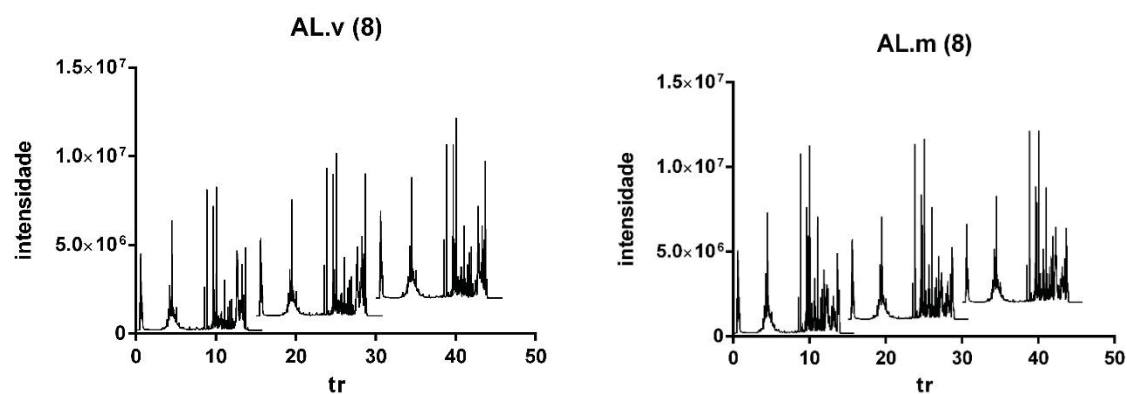
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 41 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA CWB.V.1 E CWB.M.1, EM TRIPLICATA.



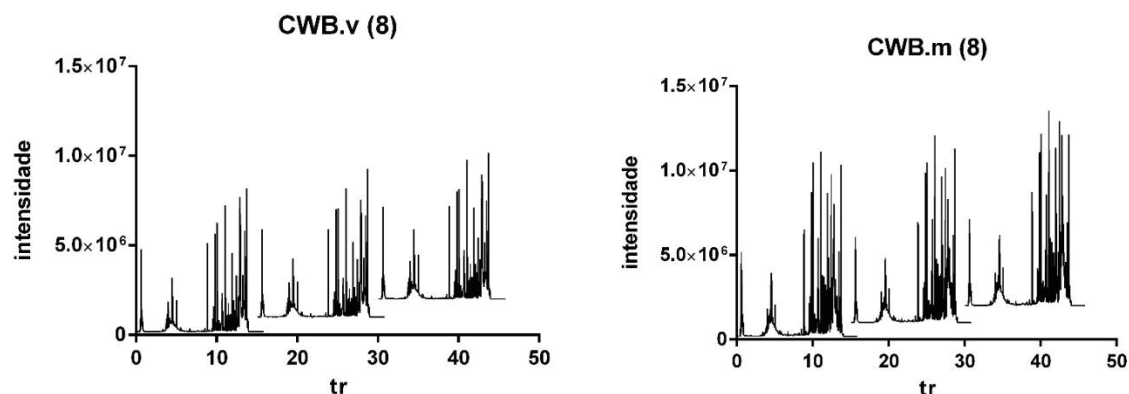
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 42 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA AL.V.8 e AL.M.8, EM TRIPLICATA.



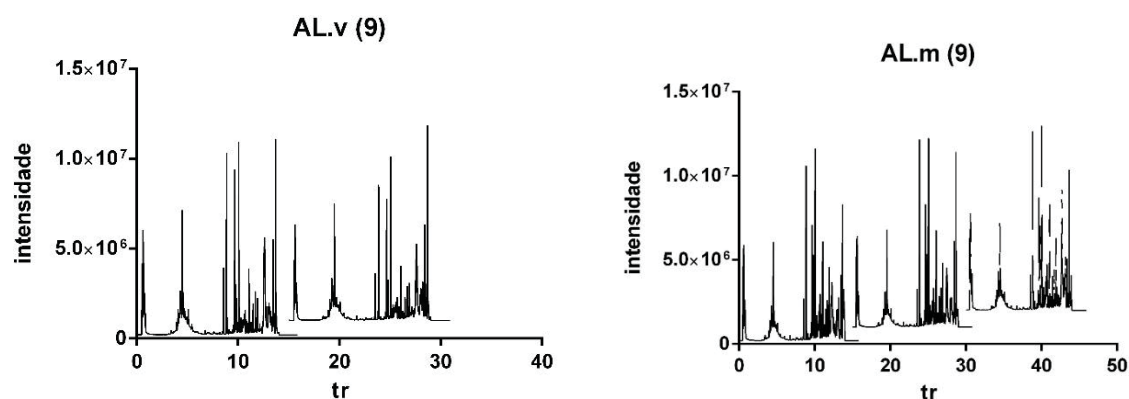
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 43 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA CWB.V.8 E CWB.M.8, EM TRIPLICATA.



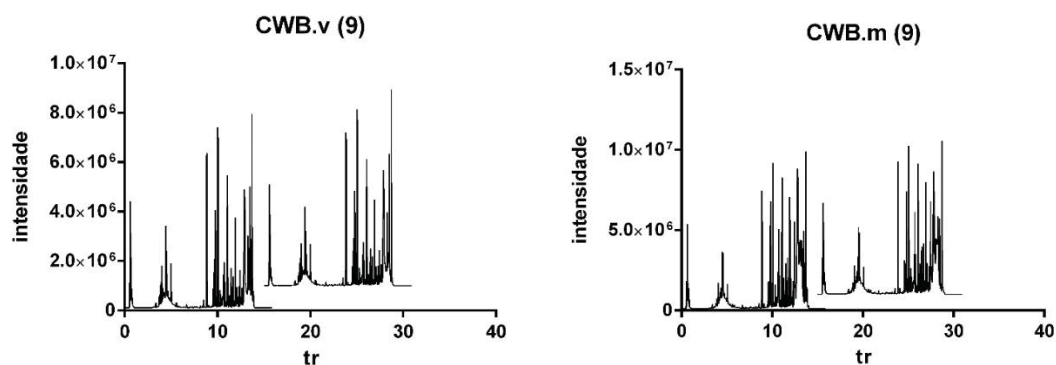
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 44 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA AL.V.9 EM DUPLICATA E AL.M.9 EM TRIPLICATA.



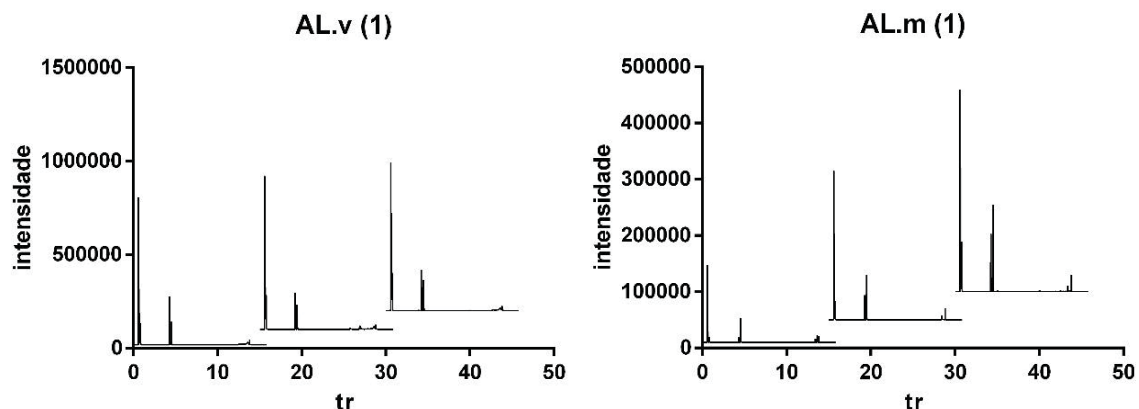
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 45 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM-ES⁺, DA AMOSTRA CWB.V.9 E CWB.M.9, EM DUPLICATA.



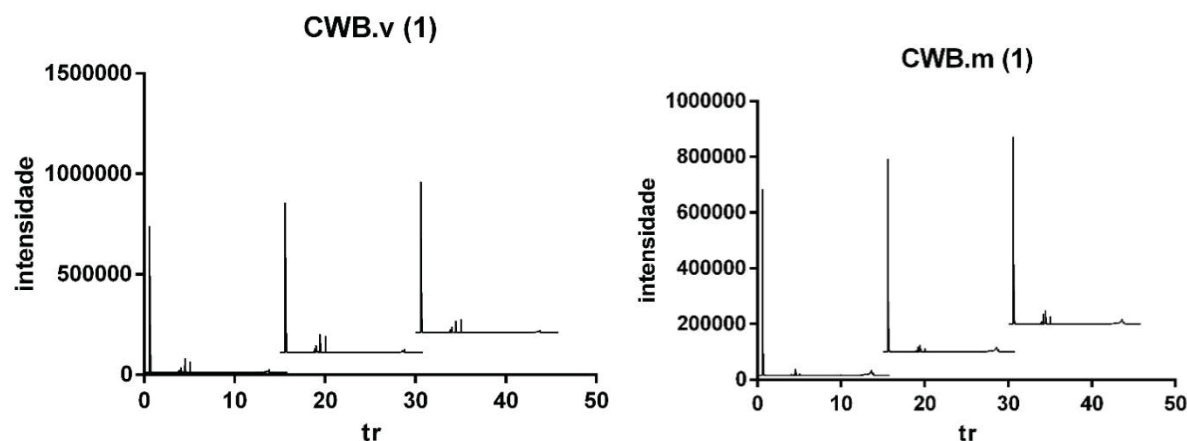
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 46 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA AL.V.1 E AL.M.1, EM TRIPLICATA.



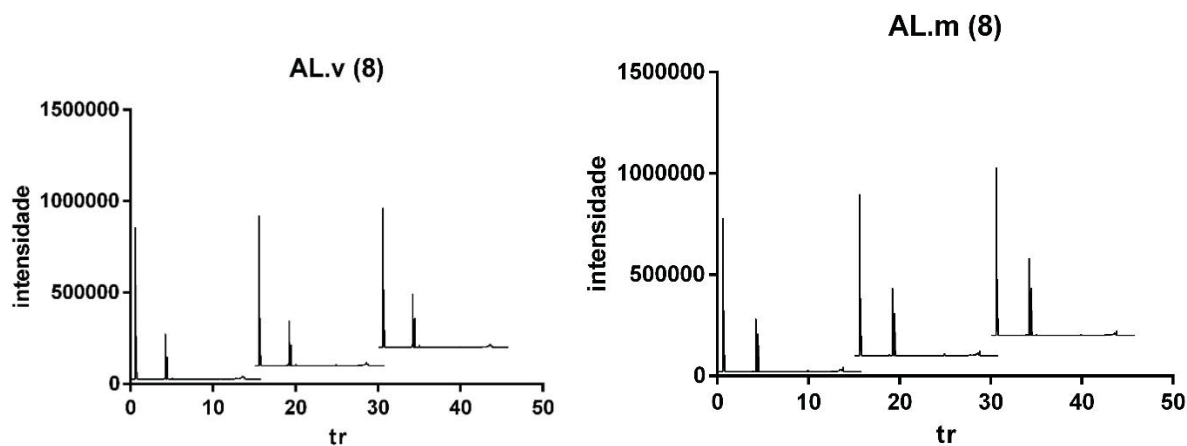
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 47 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QToF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA CWB.V.1 E CWB.M.1, EM TRIPLICATA.



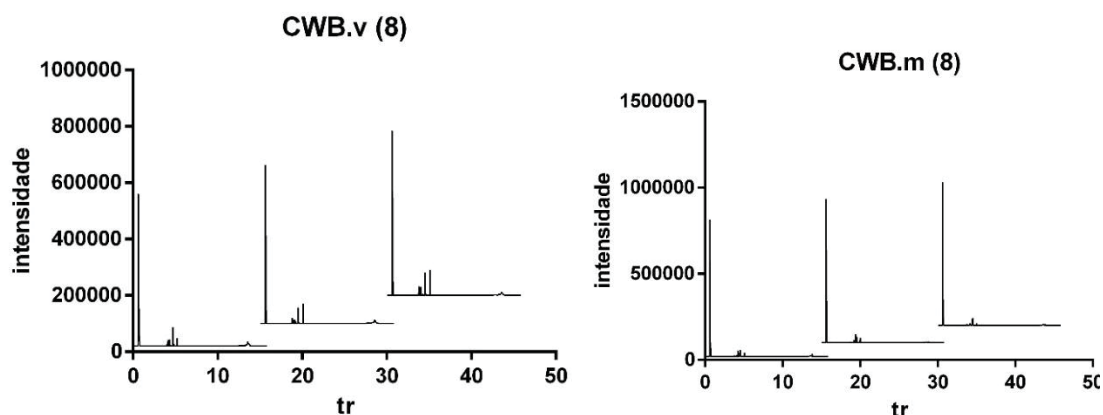
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 48 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA AL.V.8, EM TRIPLICATA.



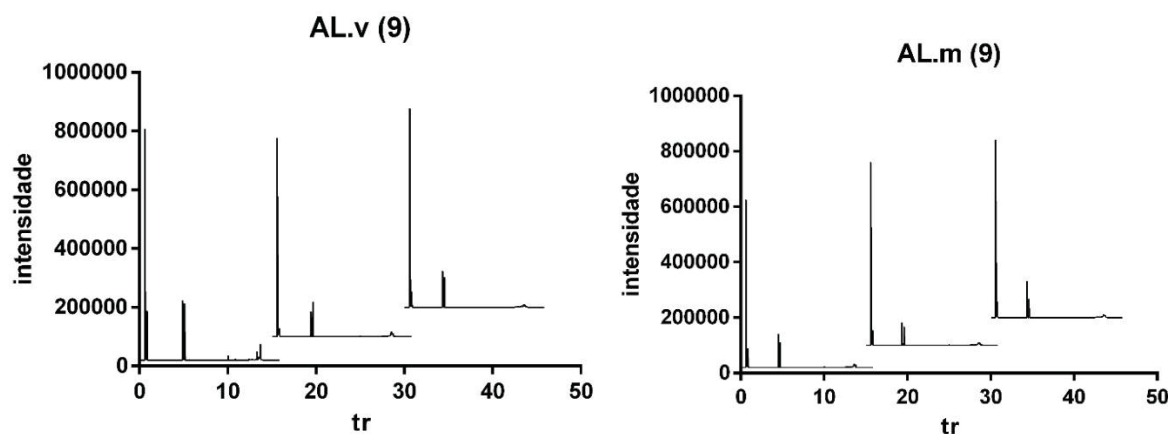
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 49 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA CWB.V.8 EM TRIPLICATA E CWB.M.8 EM DUPLICATA, EM TRIPLICATA.



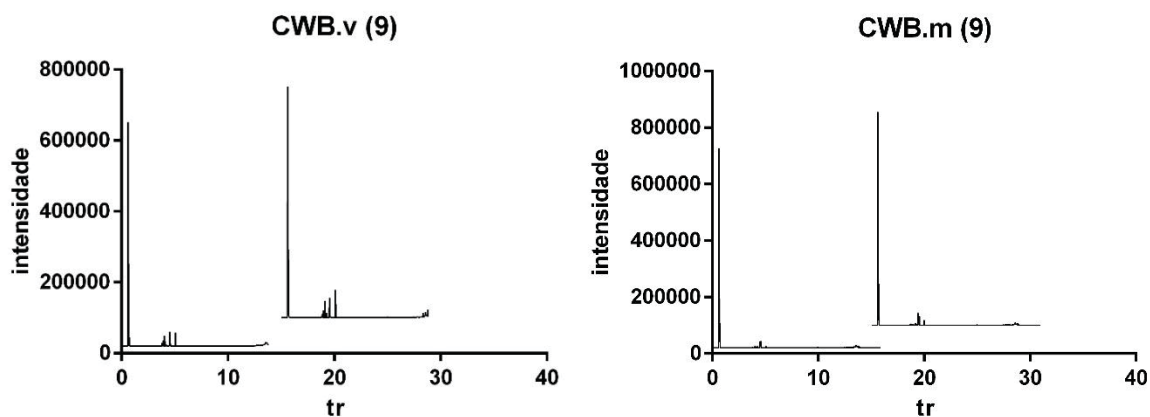
FONTE: A autora (2019).

FIGURA 50 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA AL.V.9 E AL.M.9, EM TRIPLICATA.



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 51 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLUE-QTOF-EM, ES⁻, DA AMOSTRA CWB.V.9 E CWB.M.9, EM DUPLICATA.



FONTE: A autora (2019).

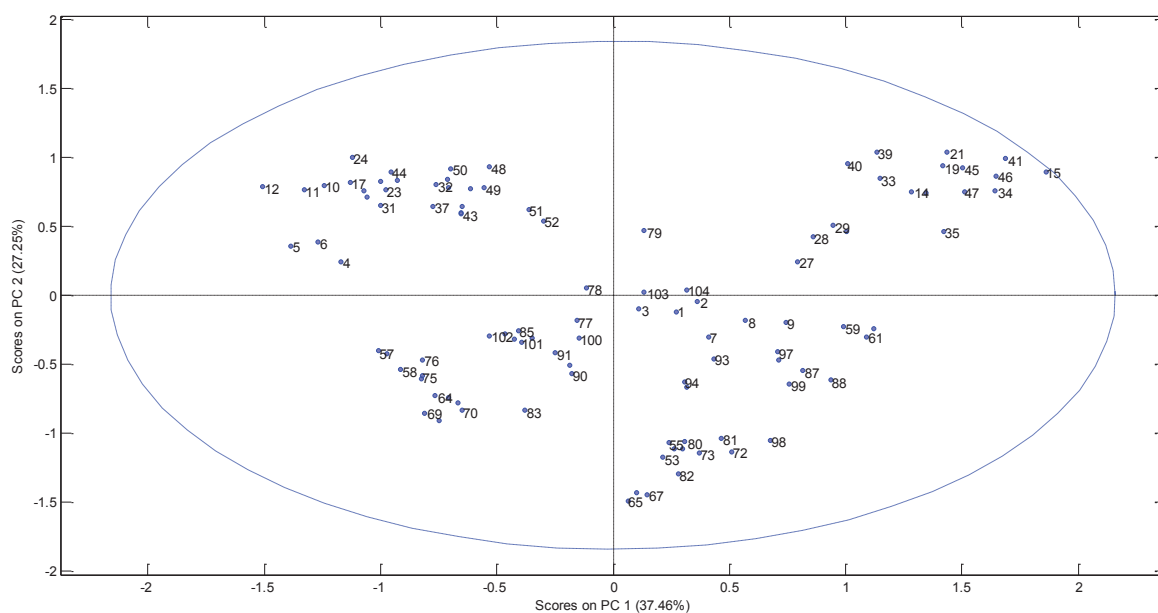
APÊNDICE 2 – DADOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.

QUADRO 3 - NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	1	2	3
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	4	5	6
EtOH 30% (v/v), G, 24h	7	8	9
EtOH 70% (v/v), G, 24h	10	11	12
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	13	14	15
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	16	17	18
EtOH 30% (v/v), G, 168h	19	20	21
EtOH 70% (v/v), G, 168h	22	23	24
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	-	25	26
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	27	28	29
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	30	31	32
EtOH 30% (v/v), G, 24h	33	34	35
EtOH 70% (v/v), G, 24h	36	37	38
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	39	40	41
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	42	43	44
EtOH 30% (v/v), G, 168h	45	46	47
EtOH 70% (v/v), G, 168h	48	49	50
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	51	52	-
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	53	54	55
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	56	57	58
EtOH 30% (v/v), G, 24h	59	60	61
EtOH 70% (v/v), G, 24h	62	63	64
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	65	66	67
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	68	69	70
EtOH 30% (v/v), G, 168h	71	72	73
EtOH 70% (v/v), G, 168h	74	75	76
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	77	78	79
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	80	81	82
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	83	84	85
EtOH 30% (v/v), G, 24h	86	87	88
EtOH 70% (v/v), G, 24h	88	89	90
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	91	92	93
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	94	95	96
EtOH 30% (v/v), G, 168h	97	98	99
EtOH 70% (v/v), G, 168h	100	101	102
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	103	104	-

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 52 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS CWB.M, CWB.V, AL.M E AL.V NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



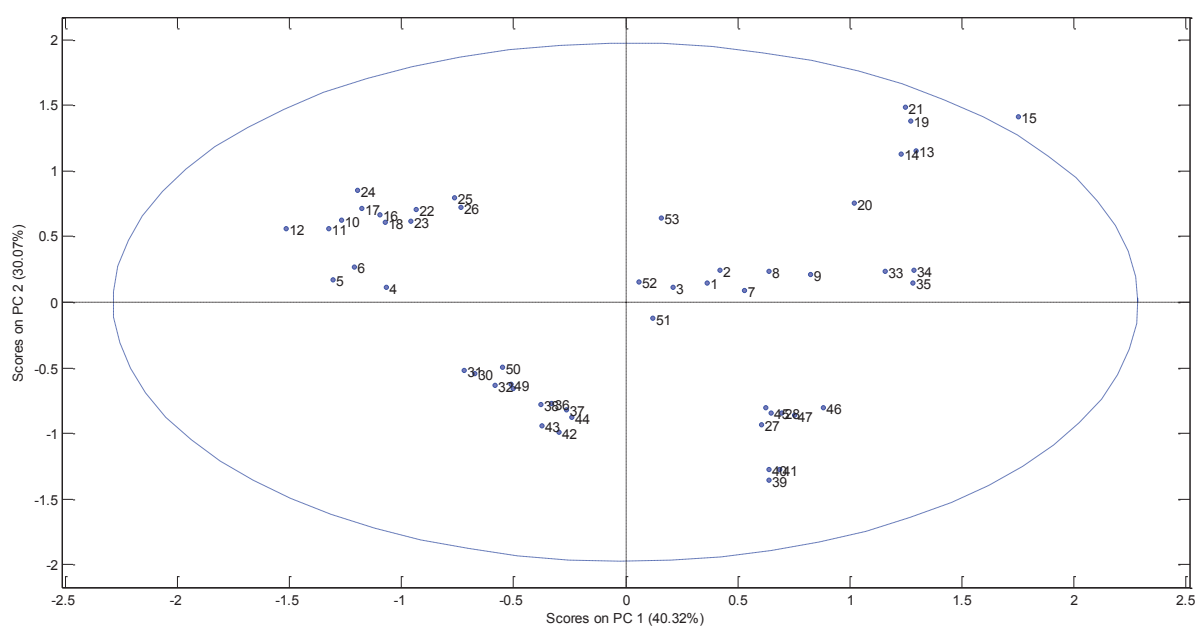
FONTE: A autora (2019).

QUADRO 4 - NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M E AL.M UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	1	2	3
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	4	5	6
EtOH 30% (v/v), G, 24h	7	8	9
EtOH 70% (v/v), G, 24h	10	11	12
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	13	14	15
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	16	17	18
EtOH 30% (v/v), G, 168h	19	20	21
EtOH 70% (v/v), G, 168h	22	23	24
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	-	25	26
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	27	28	29
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	30	31	32
EtOH 30% (v/v), G, 24h	33	34	35
EtOH 70% (v/v), G, 24h	36	37	38
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	39	40	41
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	42	43	44
EtOH 30% (v/v), G, 168h	45	46	47
EtOH 70% (v/v), G, 168h	48	49	50
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	51	55	53

Fonte: A autora (2019).

FIGURA 53 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS MADURAS (CWB.M E AL.M) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



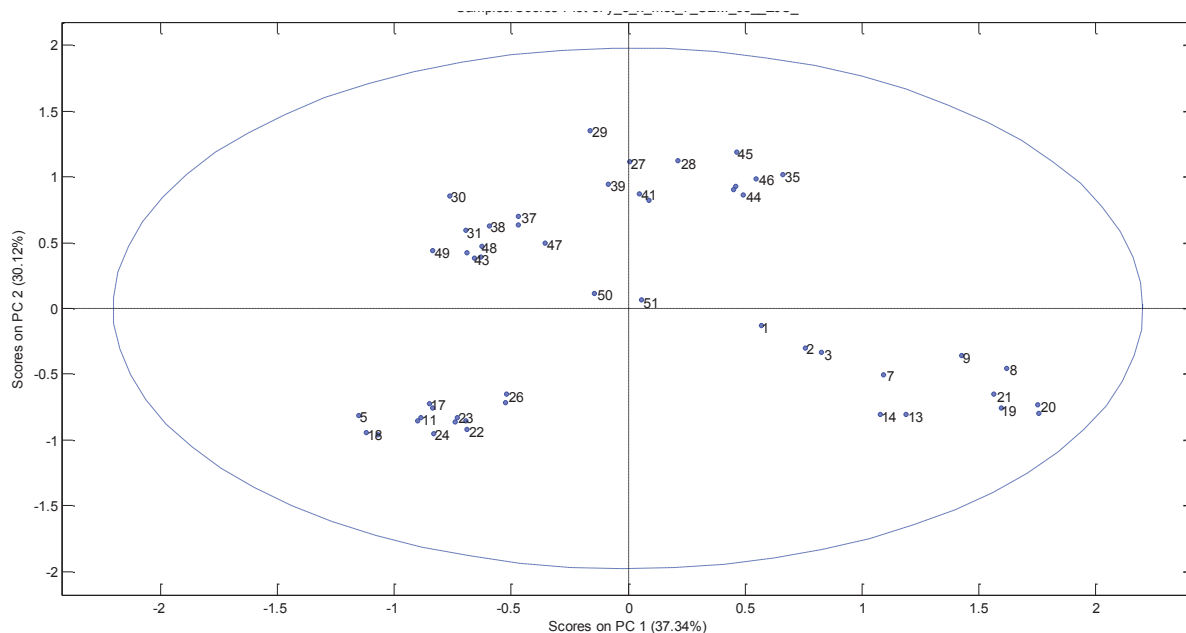
FONTE: A autora (2019).

QUADRO 5 - NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.V E CWB.M UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	1	2	3
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	4	5	6
EtOH 30% (v/v), G, 24h	7	8	9
EtOH 70% (v/v), G, 24h	10	11	12
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	13	14	15
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	16	17	18
EtOH 30% (v/v), G, 168h	19	20	21
EtOH 70% (v/v), G, 168h	22	23	24
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	25	26	-
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	27	28	29
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	30	31	32
EtOH 30% (v/v), G, 24h	33	34	35
EtOH 70% (v/v), G, 24h	36	37	38
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	39	40	41
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	42	43	-
EtOH 30% (v/v), G, 168h	44	45	46
EtOH 70% (v/v), G, 168h	47	48	49
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	50	51	-

Fonte: A autora (2019).

FIGURA 54 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS IMATURAS (CWB.V E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



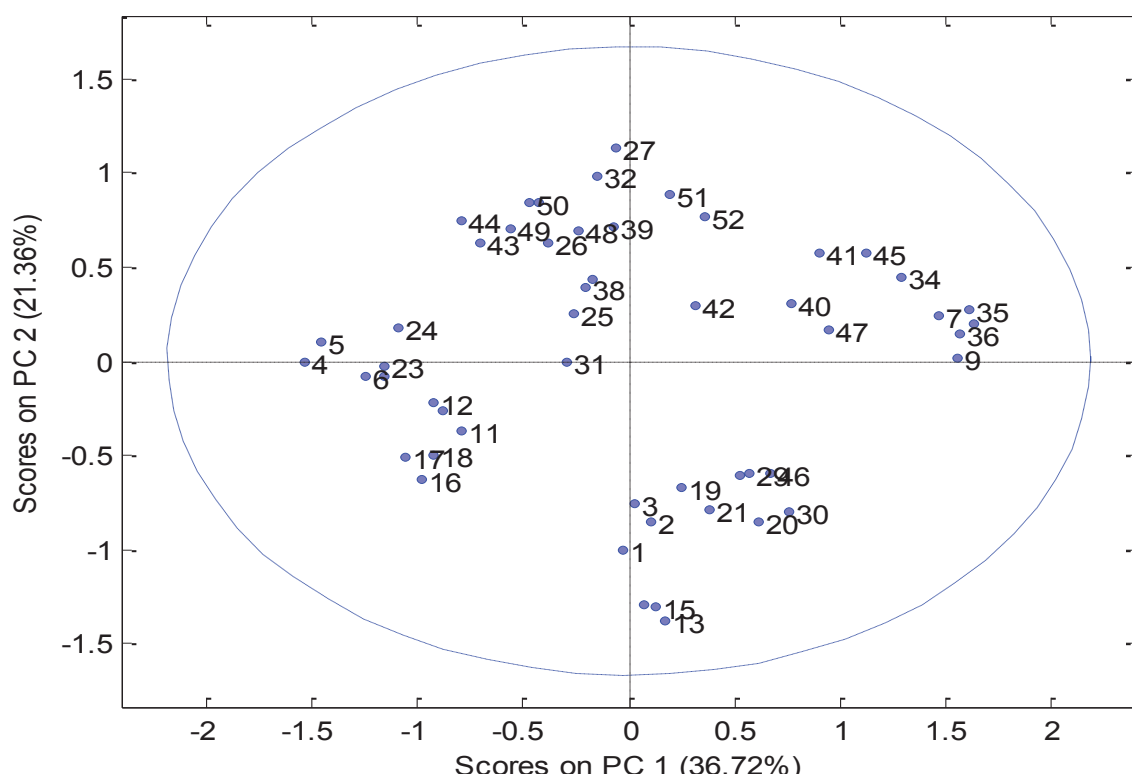
FONTE: A autora (2019).

QUADRO 6 - NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS AL.M E AL.V UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	1	2	3
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	4	5	6
EtOH 30% (v/v), G, 24h	7	8	9
EtOH 70% (v/v), G, 24h	10	11	12
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	13	14	15
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	16	17	18
EtOH 30% (v/v), G, 168h	19	20	21
EtOH 70% (v/v), G, 168h	22	23	24
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	25	26	27
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (AL.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	28	29	30
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	31	32	33
EtOH 30% (v/v), G, 24h	34	35	36
EtOH 70% (v/v), G, 24h	37	38	39
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	40	41	42
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	43	44	-
EtOH 30% (v/v), G, 168h	45	46	47
EtOH 70% (v/v), G, 168h	48	49	50
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	51	52	-

Fonte: A autora (2019).

FIGURA 55 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM ROSÁRIO DO IVAÍ-PR (AL.M E AL.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



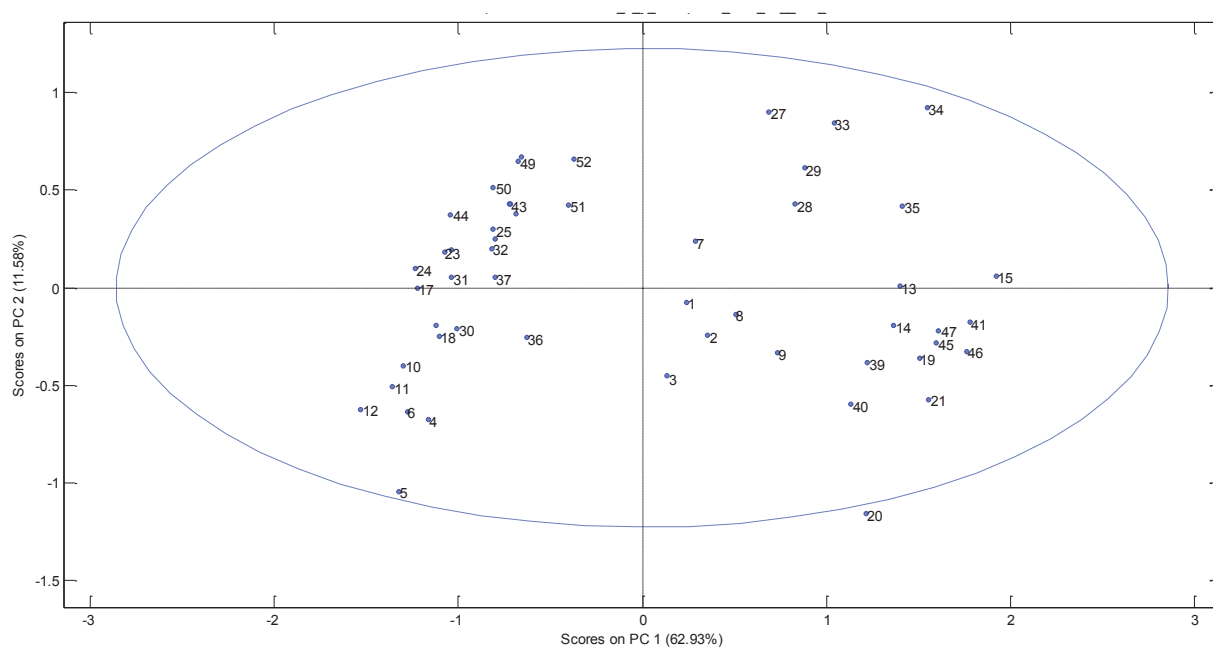
FONTE: A autora (2019).

QUADRO 7 - NÚMEROS REFERENTES AS AMOSTRAS CWB.M E CWB.V, UTILIZADAS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.M)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	1	2	3
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	4	5	6
EtOH 30% (v/v), G, 24h	7	8	9
EtOH 70% (v/v), G, 24h	10	11	12
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	13	14	15
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	16	17	18
EtOH 30% (v/v), G, 168h	19	20	21
EtOH 70% (v/v), G, 168h	22	23	24
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	-	25	26
CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	Nº DA AMOSTRA (CWB.V)		
EtOH 30% (v/v), FS, 24h	27	28	29
EtOH 70% (v/v), FS, 24h	30	31	32
EtOH 30% (v/v), G, 24h	33	34	35
EtOH 70% (v/v), G, 24h	36	37	38
EtOH 30% (v/v), FS, 168h	39	40	41
EtOH 70% (v/v), FS, 168h	42	43	44
EtOH 30% (v/v), G, 168h	45	46	47
EtOH 70% (v/v), G, 168h	48	49	50
EtOH 50% (v/v), SF, 72h	51	55	-



Fonte: A autora (2019).



FIGURA 56 - GRÁFICO DE ESCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CURITIBA-PR (CWB.M E CWB.V) NAS NOVE CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.



FONTE: A autora (2019).

ANEXO 1 – DEPÓSITO DE EXSICATAS MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA

	PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL	MBM 371877 
<p>Lauraceae</p> <p><i>Persea americana</i> Mill.</p> <p>Det.: Soares, F.S., 23.X.2018</p> <p>Brasil, Paraná, Curitiba, rua Alziro Zarur, nº 85.</p> <p>Soares, F.S. 1, 11.IX.2017.</p> <p>Árvore, 4 m, com flores.</p>		

	PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL	MBM 363120 
<p>Lauraceae</p> <p><i>Persea americana</i> Mill.</p> <p>Det.: Soares, F.S. 24.I.2019</p> <p>Brazil, Paraná, Rosário do Ivaí, Rodovia PR-082, na margem. 24°15'26" S, 51°15'54" W</p> <p>Soares, F.S. 2; 2 XI 2018</p> <p>Árvore com 9 m de altura; flores brancas. No meio do pasto.</p> <p><small>Duplicatas: MBM</small></p>		

ANEXO 2 – CADASTRO DE ATIVIDADE DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO - SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A89CC92

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A89CC92
Usuário:	Universidade Federal do Paraná
CPF/CNPJ:	75.095.679/0001-49
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Persea americana

Persea americana

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade:	Caracterização química e atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de semente de Persea americana Mill. Lauraceae
----------------------	---

Equipe

Thalita Gilda Santos	Universidade Federal do Paraná
Fernanda Saad Soares	Universidade Federal do Paraná
Mariana Millan Fachi	Universidade Federal do Paraná
Roberto Pontarolo	Universidade Federal do Paraná
Amanda Rabello Crisma	Universidade Federal do Paraná

Iara José de T. Messias-Reason

Universidade Federal do Paraná

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: Soares F5, Fachi MM, Pontarolo R, Santos TG,

Data do Cadastro: 02/11/2018 23:08:53

Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 23:13 de 02/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN